

REAKTIVE TRÄGER MIT MALEINIMIDGRUPPEN ZUR IMMOBILISIERUNG VON ENZYMEN

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
des Fachbereiches Chemie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Hermann-Josef Middeke

1903

REAKTIVE TRÄGER MIT MALEINIMIDGRUPPEN

ZUR IMMOBILISIERUNG VON ENZYMEN

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde
des Fachbereiches Chemie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Hermann-Josef Middeke

Erster Gutachter: Prof.Dr.G.Manecke

Zweiter Gutachter: Prof.Dr.G.Kossmehl

Tage der mündlichen Prüfungen:

8.Juni 1983

23.Juni 1983

8.Juli 1983

Tag der Promotion:

Diese Arbeit wurde am Fritz-Haber-Institut der Max-Planck-Gesellschaft unter der Anleitung von Herrn Prof.Dr.G. Manecke angefertigt.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof.Dr.G.Manecke,der diese Arbeit anregte,mir ihre Durchführung ermöglichte und stetes Interesse an ihrem Fortgang hatte.Er ermöglichte es,daß mir ein Arbeitsplatz im Fritz-Haber-Institut und die finanziellen Mittel zur Durchführung dieser Arbeit von der Max-Planck-Gesellschaft zur Verfügung gestellt wurden.Auch hierfür möchte ich ihm sowie der Max-Planck-Gesellschaft vielmals danken.

Allen Kollegen,die zum Gelingen dieser Arbeit durch viele anregende Diskussionen und stete Hilfsbereitschaft beigetragen haben,sei an dieser Stelle herzlich gedankt:

Herrn Dr.W.Storck

Herrn D.Polakowski

Frau G.Lorenz

Den Mitarbeitern im Institut Für Organische Chemie der Freien Universität Berlin,insbesondere Frau Kamprath,danke ich für die Durchführung der Elementaranalysen.

<u>Inhalt</u>	Seite
1. Einleitung	11
2. Problemstellung	12
3. Spezieller Teil	14
3.1. Darstellung und Modifizierung der Polymeren	14
3.1.1. Poly(vinylalkohol)	15
3.1.1.1. Vernetzung von Poly(vinylalkohol)	15
3.1.1.2. Umsetzung des vernetzten Poly(vinylalkohol)s mit Maleinimidderivaten	17
3.1.1.3. Charakterisierung der entstandenen Träger	18
3.1.2. Poly(acrylnitril)	25
3.1.2.1. Darstellung der Polymeren auf der Basis von Acrylnitril	25
3.1.2.2. Reaktionen der polymeren Nitrile mit N-Methylolmaleinimid	29
3.1.2.3. Charakterisierung der maleinimidhaltigen Polymeren auf der Basis von Poly(acrylnitril)	32
3.1.3. Polymere mit Thiolgruppen	38
3.1.3.1. Darstellung thiolgruppenhaltiger Träger	38
3.1.3.2. Charakterisierung der thiolgruppenhaltigen Polymeren	40
3.1.3.3. Aktivierung der thiolgruppenhaltigen Träger	44
3.1.4. Reaktive Träger auf der Basis von Carbonsäurederivaten	46
3.1.4.1. Darstellung eines polymeren Säurechlorids und Veresterungsversuche mit N-Methylolmaleinimid	47
3.1.4.2. Copolymerisation gemischter Säureanhydride und deren Reaktion mit N-Methylolmaleinimid	48
3.1.4.3. Copolymere mit Maleinsäureanhydrid	50
3.1.4.4. Veresterung des polymeren Carbonsäureanhydrids	51
3.1.4.5. Charakterisierung der polymeren Carbonsäure-N-Methylol-Ester	55
3.2. Eigenschaften und chemische Modifizierung der verwendeten Enzyme	58
3.2.1. Bestimmung der Enzymaktivitäten	60
3.2.1.1. Aktivität des Trypsins	60
3.2.1.2. Aktivität des α -Chymotrypsins	63

3.2.1.3.	Aktivität der Ribonuclease	63
3.2.1.4.	Aktivität von Urease	64
3.2.1.5.	Aktivität von Katalase	66
3.2.1.6.	Aktivität von Lysozym	69
3.2.2.	Thiolierungsreaktionen	71
3.2.2.1.	Thiolierungsreaktionen mit AHTL	72
3.2.2.2.	Thiolierung mit polymer gebundenem N-Succinimidyl-3-thiopropionat	79
3.2.3.	Einführung von Maleinimidgruppen in Enzymmoleküle	81
3.2.3.1.	Maleinimidierung von Enzymen mit N-Ethoxycarbonylmaleinimid (ECM)	82
3.2.3.2.	Maleinimidierung von α -Chymotrypsin mit reaktiven N-Maleinimidocarbonsäureestern	85
3.3.	Immobilisierungsreaktionen	87
3.3.1.	Immobilisierung thiolgruppenhaltiger Proteine an reaktive Träger auf der Basis von Poly(vinylalkohol)	88
3.3.1.1.	Untersuchung der Wirkung von Sauerstoff auf das Immobilisierungsergebnis	88
3.3.1.2.	Zeitabhängigkeit der Immobilisierungsreaktion	89
3.3.1.3.	Auswirkung der Reaktionstemperatur bei der Immobilisierung	92
3.3.1.4.	Einfluß des pH-Wertes auf die Immobilisierungsreaktion	96
3.3.1.5.	Immobilisierung bei verschiedenen Enzymkonzentrationen	97
3.3.1.6.	Wirkung von Harnstoff bei der Immobilisierung	106
3.3.1.7.	Auswirkung der Anzahl der Thiolgruppen des thiolierten α -Chymotrypsins auf die Immobilisierungsreaktion	110
3.3.1.8.	Immobilisierung verschiedener thiolgruppenhaltiger Enzyme	111
3.3.1.9.	Vergleich der Träger 1,2 und 3 untereinander	113
3.3.1.10.	Weitere Charakterisierung der Immobilisate an Trägern aus Poly(vinylalkohol)	115
3.3.2.	Immobilisierung thiolgruppenhaltiger Enzyme an reaktiven Trägern auf der Basis von Poly(acrylnitril)	119

3.3.2.1.	Einfluß von Sauerstoff auf die Immobilisierungsreaktion	119
3.3.2.2.	pH-Abhängigkeit der Immobilisierungsreaktion an den Trägern 5 und 9	121
3.3.2.3.	Zeitliche Abhängigkeit der Immobilisierungsreaktion	126
3.3.2.4.	Abhängigkeit der Immobilisierungsreaktion von der angebotenen Enzymmenge und der Enzymkonzentration	129
3.3.2.5.	Vergleich der Träger 5 bis 9 bei der Immobilisierung von thioliertem α -Chymotrypsin	131
3.3.2.6.	Immobilisierung weiterer thiolierter Enzyme an den Trägern 5 und 9	132
3.3.2.7.	Immobilisierung von Enzymen mit eigenen SH-Gruppen am Träger 5	133
3.3.2.8.	Kovalente Chromatografie von thioliertem α -Chymotrypsin	134
3.3.2.9.	Immobilisierung des aus der kovalenten Chromatografie erhaltenen α -Chymotrypsins (tC 16')	137
3.3.2.10.	Charakterisierung der Immobilisate an reaktiven Trägern aus Poly(acrylnitril)	137
3.3.3.	Immobilisierungsreaktionen von Proteinen an Trägern mit SH-Gruppen	140
3.3.3.1.	Vergleich der thiolgruppenhaltigen Träger 10 bis 15 bei der Immobilisierung von maleinimidiertem α -Chymotrypsin untereinander	140
3.3.3.2.	pH-Abhängigkeit der Immobilisierung von maleinimidiertem α -Chymotrypsin (mC 4)	141
3.3.3.3.	Einfluß der Reaktionstemperatur auf die Immobilisierung von maleinimidiertem α -Chymotrypsin (mC 12)	144
3.3.3.4.	Einfluß der Enzymkonzentration auf die Immobilisierung von maleinimidiertem α -Chymotrypsin (mC 8)	146
3.3.3.5.	Zeitliche Abhängigkeit der Immobilisierungsreaktion	146
3.3.3.6.	Charakteristische Eigenschaften der Immobilisate von maleinimidiertem α -Chymotrypsin am Träger 13	151

3.3.4.	Immobilisierungsreaktionen an Trägern auf der Basis von Carbonsäureanhydrid	153
3.3.4.1.	Auswirkung der Ionenstärke auf die Enzymaufnahme	154
3.3.4.2.	Einfluß des pH-Wertes auf die Enzymaufnahme	157
3.3.4.3.	Untersuchung der Hydrolyse der reaktiven Träger	158
3.3.4.4.	Immobilisierung verschiedener Enzyme	160
3.3.4.5.	Charakterisierung der Immobilisate aus polymeren Anhydriden und N-Methylolverbindungen	161
4.	Experimenteller Teil	164
4.1.	Darstellung der Monomeren	166
4.1.1.	Maleinimid	166
4.1.2.	N-Methylolmaleinimid	167
4.1.3.	Bis(maleinimidomethylether)	167
4.1.4.	N-Ethoxycarbonylmaleinimid	167
4.1.5.	Maleinsäureamide	168
4.1.6.	Maleinimiderivate durch Wasserabspaltung mit Essigsäureanhydrid	168
4.1.7.	Maleinimiderivate aus N-Ethoxycarbonylmaleinimid und Aminen	169
4.1.8.	Veresterung von Maleinimidocarbonsäuren	170
4.1.9.	N-Imidomethyl-carboxamidoalkane	170
4.1.10.	Hydroxymethylester von Dicarbonsäuren	171
4.1.11.	N-Methylolsuccinimid	171
4.1.12.	2-Mercaptoacetaldehyddimethylacetal	172
4.1.13.	2-Thiopyridon	173
4.1.14.	2,2'-Dipyridyldisulfid	174
4.1.15.	Methacrylsäurechlorid	174
4.1.16.	Abtrennung von 1,4-Divinylbenzol aus dem käuflichen Isomerengemisch	174
4.1.17.	N-Succinimidyl-3-(2-pyridyldithio)propionat	175
4.2.	Darstellung der Polymeren	176
4.2.1.	Vernetzung von löslichem Poly(vinylalkohol)	176
4.2.2.	Radikalische Polymerisationsreaktionen	177
4.2.3.	Derivatisierung von Poly(vinylalkohol) mit Acetalen	177

4.2.4.	Derivatisierung von Polymeren mit 1-Chlor-2,3-epoxypropan	178
4.2.5.	Darstellung reaktiver Disulfide aus Polymeren mit Thiolgruppen	178
4.2.5.1.	Reaktion mit 2,2'-Dipyridyldisulfid	178
4.2.5.2.	Reaktion mit N-Succinimidyl-3-(2-pyridyldithio)-propionat (SPDP)	179
4.2.6.	Derivatisierung der polymeren Nitrile	179
4.2.7.	Derivatisierung der polymeren Anhydride	180
4.3.	Reaktionen zur Modifizierung von Proteinen	180
4.3.1.	Thiolierungsreaktionen mit N-Acetyl-D.L-homocysteinethiolacton (AHTL)	180
4.3.2.	Maleinimidierung mit N-Ethoxycarbonylmaleinimid	181
4.3.3.	Maleinimidierung mit reaktiven Maleinimido-carbonsäureestern	181
4.4.	Immobilisierungsreaktionen	182
4.4.1.	Diskontinuierliches Verfahren	182
4.4.2.	Kontinuierliche Verfolgung der Immobilisierungsreaktion	182
4.4.3.	Kovalente Chromatografie von thioliertem α -Chymotrypsin (tC 16)	183
4.5.	Analytische Verfahren	184
4.5.1.	Eiweißbestimmung mit Folin-Ciocalteus Phenolreagenz	184
4.5.2.	Quantitative Thiolgruppenbestimmung mit Bis-(4-nitrophenyl)disulfid-3,3'dicarbonsäure	185
4.5.3.	Quantitative Bestimmung von Maleinimidgruppen	186
4.5.4.	Messung der Quellung von Polymeren	186
4.5.5.	Messung der Enzymaktivitäten	187
4.5.5.1.	pH-statische Aktivitätsmessung	187
4.5.5.2.	Absorptiostatische Aktivitätsmessung	187
4.5.5.3.	Bestimmung der Aktivität von Lysozym	188
5.	Zusammenfassung	189
6.	Literaturverzeichnis	199
7.	Anhang	204

1. Einleitung

Seit der Entdeckung, daß Maleinimid und seine Derivate mit Thiol-
len reagieren, sind viele Untersuchungen auf diesem Gebiet er-
folgt. Ein Ziel war es, den Mechanismus dieser Reaktion aufzu-
klären, ein anderes, die Reaktion analytisch auszunutzen. Gerade
zur Bestimmung von Thiolgruppen ist eine Vielzahl von Substan-
zen mit Maleinimidfunktionen entstanden. Eine mögliche antikan-
zerogene Wirkung von Maleinimiddervaten und die Entdeckung ei-
ner natürlich vorkommenden Maleinimidverbindung haben diese Ar-
beiten noch intensiviert.

Maleinimid und seine Derivate reagieren in einer nucleophilen
Reaktion zweiter Ordnung mit SH-Gruppen, wobei die Thiolgruppe
an die Doppelbindung des Maleinimids addiert wird¹⁻⁴. Sowohl Ma-
leinimid als auch das nach der Reaktion entstandene Succinimid-
Derivat sind gegen Hydrolyse empfindlich⁵⁻⁷. Bei höheren pH-Wer-
ten lagert sich das Succinimiddervat zu einem Thiazan um⁵. In
stark alkalischem Medium bildet sich mit einem Überschuß an Ma-
leinimid ein intensiv roter Farbstoff, welcher zur Identifizie-
rung von Thiolen ausgenutzt werden kann³. Von den zur quantita-
tiven Bestimmung von Thiolgruppen verwendeten Maleinimidverbin-
dungen sollen hier nur einige erwähnt werden: Zunächst das N-
Ethylmaleinimid⁸, dessen Absorption bei 302 nm nach der Reakti-
on mit SH-Gruppen verschwindet⁹⁻¹¹, dann das N-(4-Dimethylamino-
3,5-dinitrophenyl)maleinimid¹² und 1-Naphthylmaleinimid¹³ und
schließlich das N-4-(2-Benzoxazolyl)phenylmaleinimid¹⁴ und das
N-(3-Pyren)maleinimid¹⁵. Obwohl Reaktionen von Maleinimidverbin-
dungen mit Aminogruppen oder Imidazolderivaten erfolgen können,
läßt sich durch geeignete Bedingungen die Reaktion des Malein-
imids auf Thiole beschränken^{16,17}. Die Verwendung von Maleinimid-
abkömmlingen hat sich aber nicht nur auf den Nachweis von Thiol-
gruppen beschränkt. Durch die Bindung an Proteine und nachfolgen-
de Spaltung läßt sich die Umgebung der SH-Gruppen eines Prote-
ins aufklären¹⁸, durch Blockierung von Thiolgruppen in aktiven
Zentren von Enzymen läßt sich der Mechanismus der enzymatischen
Reaktion erforschen^{4,19,20}. Schließlich werden bifunktionelle
Maleinimide verwendet, um SH-haltiges biologisches Material zu
vernetzen²¹⁻³⁰. Auch das natürlich vorkommende Maleinimiddervat



Showdomycin (3-beta-D-Ribofuranosyl-maleinimid) wirkt durch Acylierung von SH-Gruppen als Inhibitor verschiedener Enzyme sowohl in Ascites-Zellen als auch von verschiedenen Enzymen in gramnegativen Bakterien^{31,32}.

Wegen der hohen Spezifität der Maleinimiderivate gegen SH-Gruppen, der hohen Reaktionsgeschwindigkeit mit Thiolgruppen auch bei niedrigen pH-Werten und der Fähigkeit, in sehr geringen Konzentrationen zu reagieren^{33,34}, sollte es mit einer polymer gebundenen Maleinimidgruppe möglich sein, thiolgruppenhaltige Proteine an polymere Träger zu binden³⁵⁻³⁸. Für die Immobilisierung kommen natürlich nur solche Enzyme in Frage, deren SH-Gruppen für die biologische Aktivität nicht essentiell sind. Außerdem sollten die Thiolgruppen des Enzyms sterisch leicht erreichbar sein³⁹⁻⁴¹. Eine Möglichkeit, auch Enzyme ohne eigene SH-Gruppen zu binden, ergibt sich durch Thiolierung dieser Enzyme. Dabei wird meistens eine Aminogruppe des Proteins durch eine Thiolgruppe ersetzt⁴². Durch die Wahl der Reaktionsbedingungen bei der Thiolierung hat man es in der Hand, sowohl die Anzahl der ins Protein eingeführten SH-Gruppen als auch deren Position im Eiweißmolekül zu variieren.

Polymer gebundene Enzyme bieten gegenüber den löslichen Enzymen den Vorteil, leicht aus einer Reaktionsmischung entfernbar zu sein. Sie sind dann für einen weiteren Einsatz wieder verwendbar. In vielen Fällen wurde beobachtet, daß Immobilisate erheblich längere Zeit stabil sind, als die entsprechenden löslichen Enzyme. Im allgemeinen nimmt ihre Temperaturstabilität ebenfalls zu. Bei proteinspaltenden Enzymen wird die Eigenverdauung durch die Immobilisierung ausgeschaltet. Wegen ihrer Eigenschaften erschließen immobilisierte Enzyme neue Möglichkeiten für die organische Chemie und Biotechnologie. Sie finden Einsatz auch in der medizinischen Diagnostik und in der Analytik. Die Möglichkeit, ganze Enzymsysteme (Multienzyme) und Zellen zu immobilisieren führt zu weiteren leistungsfähigen Biokatalysatoren.

2. Problemstellung

Das Ziel dieser Arbeit war, polymere Maleinimiderivate darzustellen und mit diesen verschiedene Enzyme zu immobilisieren. Dabei sollten die Immobilisierungsreaktionen genau untersucht

werden. Enzyme ohne freie Thiolgruppen sollten vor der Immobilisierungsreaktion thioliert werden.

Ausgehend vom Maleinimid bieten sich verschiedene Reaktionen an, die zur Verknüpfung mit einem reaktiven Polymeren ausgenutzt werden können. So ist das Maleinimid in der Lage, mit Formaldehyd zu reagieren und dabei das N-Hydroxymethylmaleinimid zu bilden. Dieses kann mit PCl_3 in das N-Chlormethylmaleinimid überführt werden. In weiterführenden Reaktionen wird dann die Cl-Gruppe oder die OH-Gruppe substituiert. Als Reaktionspartner kommen Aromaten, Carbonsäuren, Alkohole, Nitrile, Cyanate und Thiocyanate in Frage^{24, 43}. Die Maleinimidgruppe läßt sich aber auch erzeugen, indem man Maleinsäureanhydrid mit einem Amin reagieren läßt und dann den Ringschluß zum Imid vollzieht. Dabei entstehen je nach Wahl des wasserabspaltenden Mittels ein Maleinimid- oder Isomaleinimiderivat⁴⁴⁻⁵⁰.

Die Polymeren, an welche später Enzyme gebunden werden sollen, müssen eine gute Zugänglichkeit der Maleinimidgruppen gewährleisten. Es kommen also für die Reaktion mit Maleinimiderivaten nur solche reaktiven Polymere in Frage, die entweder gute Quellungseigenschaften zeigen oder eine Schwammstruktur haben, deren Hohlräume vom Proteinmolekül erreicht werden können. Die Quellung der polymeren Gele sollte aber wegen der mechanischen Stabilität der Immobilisate nicht zu hoch sein. Aus demselben Grund dürfen die Polymeren mit Schwammstruktur keine zu großen Hohlräume aufweisen, da sonst ihre Matrix zusammenbricht, was in einem starken Abrieb der Harze resultieren würde.

Die Matrix der zur Immobilisierung eingesetzten reaktiven Träger kann sowohl neutral als auch sauer oder basisch sein. Neutrale Matrices schließend die Möglichkeit einer ionischen Wechselwirkung des Enzyms mit dem Träger aus, so daß die Immobilisierungsreaktion hauptsächlich von der bindenden Maleinimidgruppe abhängt. Je nach dem isoionischen pH-Wert des zu untersuchenden Enzyms können ionische Matrices aber auch zunächst das Enzym aus einer Lösung an ihrer Oberfläche anreichern und so eine kovalente Bindung erleichtern⁵¹.

An die dargestellten Träger, die als reaktive Gruppe die Maleinimidgruppierung aufweisen, sollten verschiedene SH-Gruppen enthaltende Enzyme gebunden werden und dabei die Auswirkungen der

Erreichbarkeit der Maleinimidgruppen am Träger vom Enzym untersucht werden. Ebenso sollte die Auswirkung der Enzymkonzentration, der Temperatur, des pH-Wertes beim Umsatz, der Zeitdauer der Immobilisierungsreaktion, der Konzentration von strukturaufweitenden Reagenzien sowie des Luftsauerstoffs auf die Immobilisierungsreaktion untersucht werden.

Da die Thiolgruppen der meisten SH-haltigen Enzyme für deren Aktivität essentiell sind (zum Beispiel in Papain, Bromelin, Ficin und Alkohol-Dehydrogenase), können bei dieser Immobilisierungsreaktion nur solche Enzyme verwendet werden, deren SH-Gruppen von keiner großen Bedeutung für die enzymatische Aktivität sind (Katalase). Ebenso kommen Enzyme in Frage, bei denen nur ein Teil der Thiolgruppen die Aktivität beeinflußt (Urease). Um auch andere Enzyme, die keine nativen Thiolgruppen aufweisen, an Polymere mit Maleinimidgruppen binden zu können, müssen diese thioliert werden. Dabei sollten sich die enzymatischen Eigenschaften möglichst nicht ändern. Hier bieten sich wegen ihrer gut untersuchten katalytischen Eigenschaften α -Chymotrypsin, Trypsin, Ribonuclease und Lysozym an. Sie sind leicht in größeren Mengen und in hoher Reinheit erhältlich.

Bei den Enzymen kann sich die Thiolierung auf den isoelektrischen pH-Wert und damit auf die elektrische Ladung und die Löslichkeit bei einem bestimmten pH-Wert auswirken, da sowohl Aminogruppen durch Thiolgruppen substituiert werden, als auch Disulfidwechsel mit im Enzym vorhandenen Disulfidbrücken auftreten können.

Die Effekte der Thiolierung und der Immobilisierung auf die katalytische Aktivität der Enzyme sollen in dieser Arbeit untersucht und die Eigenschaften der immobilisierten Enzyme durch die Wahl geeigneter Reaktionsbedingungen optimiert werden.

3.1. Darstellung und Modifizierung der Polymeren

Die Darstellung und die Eigenschaften der verschiedenen in dieser Arbeit verwendeten Polymeren soll im folgenden beschrieben werden. Um die Wirkung des Polymeren eingrenzen zu können, mußten reaktive Träger mit unterschiedlichen Strukturen synthetisiert und charakterisiert werden. Poly(vinylalkohol) wurde gewählt, um quellbare neutrale Träger zu besitzen (Träger 1-3), die sich nur durch ihren Vernetzungsgrad und den Gehalt an reaktiven Malein-

imidgruppen unterscheiden. Polymere aus Acrylnitril besaßen eine ausgeprägte Schwammstruktur, waren aber in Wasser nicht quellbar (Träger 5-7). Durch Copolymerisation des Acrylnitrils mit Acrylsäure konnten auch die Eigenschaften schwach saurer Träger für die Immobilisierungsreaktion ausgenutzt werden (Träger 8 und 9). Die hierbei erzielten Verbesserungen führten zu Versuchen, in denen N-Methylolmaleinimid mit polymerem Maleinsäureanhydrid verestert wurde, um ebenfalls maleinimidgruppenhaltige reaktive Träger zu erzeugen (Träger 18, 19). Schließlich wurden zur Thiolierung von Enzym oder zur Reinigung SH-Gruppenhaltiger Proteine Polymere mit Thiolgruppen benötigt. Sie wurden sowohl ausgehend vom Poly(vinylalkohol) (Träger 10-15) als auch von Agarosegelen erhalten (Träger 16, 17).

3.1.1. Poly(vinylalkohol)

Als neutrales und hydrophiles Ausgangspolymeres zur Darstellung von reaktiven Trägern wurde Poly(vinylalkohol) in nähere Betrachtung gezogen. Um aus Poly(vinylalkohol) wasserunlösliche Harze zu bilden, muß das Polymere vernetzt werden. Um eine Reaktion mit Thiolgruppen zu ermöglichen, muß an ein solches Polymeres dann eine Maleinimidgruppe gebunden werden. Über den Vernetzungsgrad ist es möglich, verschieden kompakte Träger zu erzeugen. Der Vernetzungsgrad und die Anzahl der dem Polymeren verbliebenen Hydroxylgruppen bestimmt dann die Quellbarkeit der erhaltenen Träger. Sowohl zur Vernetzung als auch zur nachfolgenden Reaktion mit Maleinimiderivaten wurde die Acetalbildung der Hydroxylgruppen des Poly(vinylalkohol)s mit Aldehydfunktionen gewählt. Die Reaktion zum Acetal erfolgt im sauren Medium, die Acetalbindung ist auch im Säuren wieder spaltbar. In neutralem oder alkalischem Milieu ist die Acetalgruppe stabil.

3.1.1.1. Vernetzung von Poly(vinylalkohol)

Als vernetzendes Reagenz wurde Terephthalaldehyd verwendet⁵². Das vernetzte Harz enthält weder in saurer noch in basischer Umgebung ionische Gruppen. Über die Menge des eingesetzten Terephthalaldehyds ist der Vernetzungsgrad bequem einstellbar. Die Vernetzungsreaktionen wurden in wässrigem Medium durchgeführt.

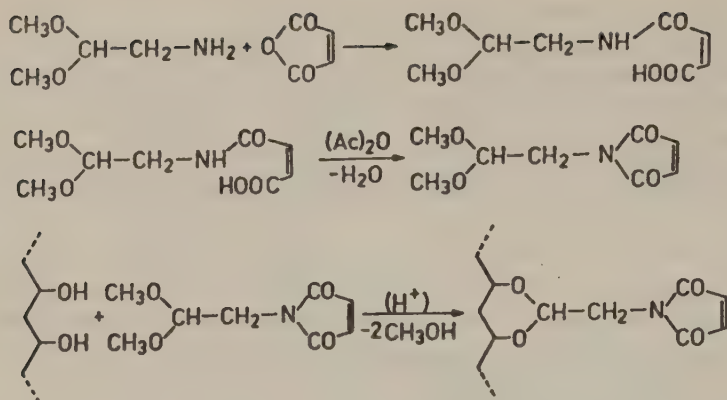
Obwohl Terephthalaldehyd in Wasser nicht gut löslich ist, reicht die Menge des in Wasser löslichen Aldehyds zur Vernetzung aus. Zunächst nicht gelöster Aldehyd wird in dem Maße gelöst, in welchem der Terephthalaldehyd mit dem Polymeren reagiert. Zur Vernetzung wurde der Poly(vinylalkohol) in heißem Wasser gelöst und in die klare, leicht gelbliche Lösung die gewählte Menge an Terephthalaldehyd eingetragen. Bei der erhöhten Temperatur ging der Terephthalaldehyd glatt in Lösung. Die eingesetzte molare Menge an Terephthalaldehyd wurde auf die molare Menge der Hydroxylgruppen des Poly(vinylalkohol)s bezogen und wird im folgenden in Molprozent angegeben. Die Lösung wurde dann abgekühlt und mit Salzsäure angesäuert. Sie erstarrte innerhalb kurzer Zeit gelartig. Das Gel wurde dann bei Raumtemperatur zwei Tage lang stark gerührt. Dabei zerfiel es in kleine Partikel. Es konnte dann leicht abfiltriert werden. Nachdem es mit Wasser säurefrei gewaschen worden war, wurde es mit steigenden Anteilen an Methanol entquollen. Das so gewonnene weiße körnige Produkt wurde durch ein grobmaschiges Sieb gepreßt und an der Luft getrocknet. Eine Trocknung im Vakuum über Kalziumchlorid führte zu Produkten mit wesentlich niedrigerer Quellbarkeit. Das entstandene farblose, sehr harte klare Polymere wurde gemahlen und auf Korngrößen zwischen 0,1 mm und 0,2 mm ausgesiebt. Eine nachfolgende Analyse der Größenverteilung der Harzpartikel zeigte, daß 95,5 Prozent des Volumens des vernetzten Harzes aus Partikeln mit einer Größe zwischen 0,1 mm und 0,2 mm bestand. Die restlichen 4,5 Prozent verteilten sich auf Teilchen mit einer Größe zwischen 0,018 mm bis 0,03 mm. Die häufigste mittlere Teilchengröße betrug 0,16 mm. Harzpartikel mit Ausdehnungen unter 0,018 mm waren im Siebgut nicht enthalten. Die Infrarotspektren der vernetzten Polymeren zeigten keine Carbonylbande. Der Aldehyd hat also mit den Hydroxylgruppen des Poly(vinylalkohol)s vollständig reagiert. In der folgenden Tabelle ist die Abhängigkeit der Schüttvolumina vom Vernetzereinsatz aufgeführt. Wie erwartet quillt das am wenigsten vernetzte Harz am stärksten.

Tab.1.Schüttvolumina von mit Terephthalaldehyd vernetztem Poly(vinylalkohol)

Vernetzerzusatz in Molprozent der Hydroxylgruppen des Poly(vinylalkohol)s	Schüttvolumina in $\text{cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$	
	trocken	in Wasser
1,0	1,90	19,54
2,0	1,91	15,66
5,0	2,05	5,33

3.1.1.2.Umsetzung des vernetzten Poly(vinylalkohol)s mit Maleinimidderivaten

Zurückliegende Versuche haben gezeigt, daß die Reaktion von aromatischen Maleinimidderivaten mit Poly(vinylalkohol) einen starken Rückgang der Quellung des Harzes in Wasser bewirkt⁵³. Die entstandenen reaktiven Polymeren zeigten nur eine geringe Tendenz, thiolierte Enzyme zu binden. Deshalb wurde hier zum Umsatz mit dem Harz ein aliphatisches Maleinimidderivat verwendet. Wegen der im alkalischen Medium nicht stabilen Maleinimidgruppe kamen nur wenige Verknüpfungsreaktionen mit dem Polymeren in Frage. Die Entscheidung fiel zugunsten eines aliphatischen Maleinimidderivates mit Aldehydgruppe, da eine solche Verbindung im Säuren an Poly(vinylalkohol) gebunden werden kann. Die Verbindung mit dem Polymeren erfolgte wie beim Vernetzer über die Acetalgruppe. Als Ausgangsverbindung wurde das 2-Aminoacetaldehyddimethylacetal gewählt. Diese Substanz reagiert mit Maleinsäureanhydrid zunächst zum Amid und kann dann mit Essigsäureanhydrid als wasserabspaltendem Reagenz unter Mitwirkung von Natriumacetat zum Imid zyklisiert werden. Die Anwesenheit des Maleinimidringes läßt sich mit dem Benesch-Test überprüfen³. Die so dargestellte Verbindung ist eine farblose viskose Flüssigkeit, die nach längerer Lagerung gelbliche Zersetzungsprodukte bildet. Sie ist unzersetzt bei vermindertem Druck destillierbar. Die Reaktion mit dem vernetzten Poly(vinylalkohol) wurde in wässrigem Medium unter Zusatz von Salzsäure bei 45°C durchgeführt.



Nach erfolgter Reaktion wurde das modifizierte Harz zunächst mit Wasser neutral gewaschen und dann mit Aceton extrahiert. Nach dem Trocknen an der Luft bei Raumtemperatur wurde das Polymere nochmals auf Korngrößen zwischen 0,1 mm und 0,2 mm ausgesiebt.

3.1.1.3. Charakterisierung der entstandenen Träger

Die so entstandenen Polymeren wiesen fast die gleiche Korngrößenverteilung auf, wie die vernetzten Harze vor dem Umsatz mit dem Maleinimidderivat. Durch das nochmalige Aus-sieben verteilte sich jetzt das gesamte Harzvolumen auf Korngrößen von 0,1 mm bis 0,2 mm Durchmesser. Es war eine leichte Verschiebung zu größeren Harzpartikeln zu beobachten. Die jetzt am häufigsten vorhandene Korngröße hatte einen mittleren Durchmesser von 0,17 mm.

Wie bei der Reaktion des Vernetzers mit den OH-Gruppen des Poly(vinylalkohol)s werden auch bei der Reaktion des vernetzten Polymeren mit dem Maleinimidoacetaldehydacetal Hydroxylgruppen des Polymeren gegen Acetalgruppen ausgetauscht. Da die Maleinimidgruppen nicht hydrophil sind, nimmt nach dem Umsatz mit dem Maleinimidderivat die Quellbarkeit der Harze ab. Das Ausmaß dieser Abnahme richtet sich nach der Anzahl der eingeführten Gruppen. Wegen dieser Abnahme des Schüttvolumens in gequollenem Zustand ist es nicht sinnvoll, besonders viele Maleinimidgruppen ans Polymere zu binden. Tabelle 2 zeigt den Rückgang des Schüttvolumens der verschieden hoch vernetzten

Harze nach der Reaktion mit dem Maleinimidderivat.

Tab.2.Schüttvolumina vernetzter reaktiver Träger aus Poly(vinylalkohol) vor und nach dem Umsatz mit Maleinimidoacetaldehyddimethylacetal^a.

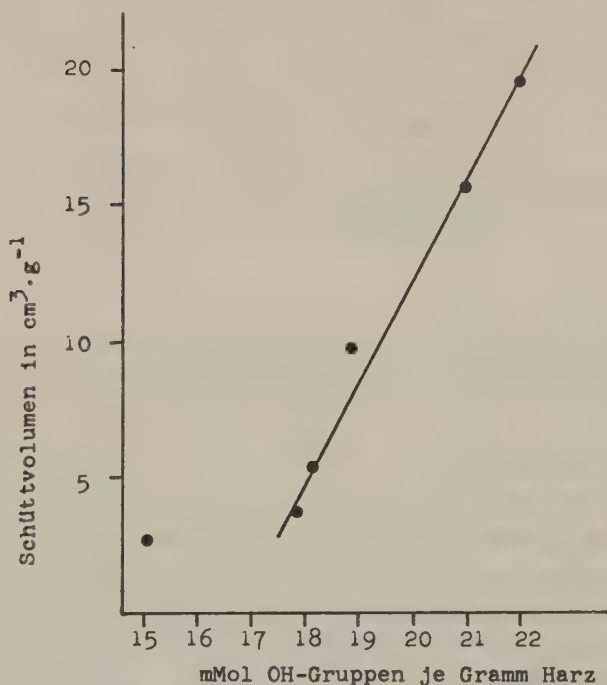
Vernetzerzusatz in Molprozent	Schüttvolumina in Wasser in $\text{cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$	
	vernetzter Poly- (vinylalkohol)	reaktiver Träger mit Maleinimidgruppen
1,0	19,54	9,77
2,0	15,66	3,82
5,0	5,33	2,77

a: Die Menge der am Harz vorhandenen Maleinimidgruppen betrug bei den hier angeführten reaktiven Trägern etwa 1,5 mMol je Gramm Harz. Sie wurde aus dem Stickstoffgehalt der Polymeren berechnet.

Die Hydroxylgruppen an den vernetzten Polymeren konnten aus der eingesetzten Menge an Vernetzer und der elementaranalytisch über den Stickstoffgehalt der Polymeren bestimmten Menge an Maleinimidgruppen leicht berechnet werden, denn von den ursprünglich am Harz vorhandenen 22,7 mMol OH-Gruppen je Gramm reagieren mit jedem Vernetzermolekül vier und mit jedem Molekül des Maleinimidderivates zwei OH-Gruppen. Die Abbildung 1 stellt die Schüttvolumina nach Quellung der Polymeren in Wasser den am Harz vorhandenen Hydroxylgruppen gegenüber.

Die Menge der ans Polymere gebundenen Maleinimidgruppen wird zum größten Teil durch die Reaktionsdauer des niedermolekularen Acetals mit dem vernetzten Polymeren bestimmt. Diese Verknüpfungsreaktion ist auch nach 60 stündiger Reaktionszeit noch nicht abgeschlossen. Für die Darstellung in Abbildung 2 wurde je etwa 1,0 g des vernetzten Polymeren mit Maleinimidoacetaldehyddimethylacetal umgesetzt. Bezogen auf die Hydroxylgruppen des Polymeren wurde das Acetal in geringem molaren Überschuß eingesetzt. Die Acetalisierung war durch Salzsäure katalysiert und fand bei etwa 45°C statt. Die Menge der aus dem Stickstoffgehalt der reaktiven Harze ermittelten Maleinimidgruppen am Polymeren ließ sich auch aus der Gewichtszunahme bei der Acetalisierungsreaktion bestimmen. Beide Werte

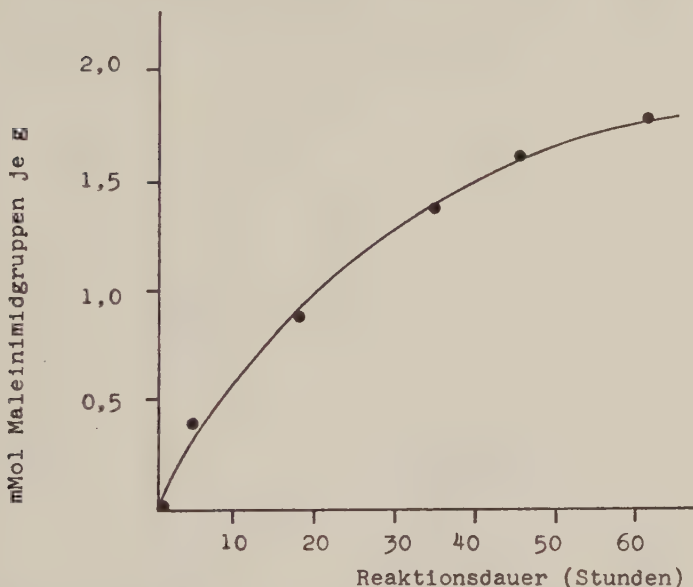
Abb.1. Abhängigkeit des Schüttvolumens von in Wasser gequollenem vernetzten Poly(vinylalkohol) von der Menge der Hydroxylgruppen am Harz^a



a: Die am Polymeren verbliebenen Hydroxylgruppen wurden berechnet, indem von den ursprünglich $22,7 \text{ mmol} \cdot \text{g}^{-1}$ für jedes Vernetzermolekül vier und für jedes Molekül des Maleinimidderivates zwei OH-Gruppen abgezogen wurden.

stimmten weitgehend überein. Alle so dargestellten reaktiven Harze gaben in alkalischem Medium mit Thiolen eine intensiv rote Farbe. Ein erfolgreicher Umsatz des Polymeren mit Maleinimidgruppen konnte auf diese Weise leicht festgestellt werden^{3,10}. Ebenso ist ein erfolgter Umsatz von Maleinimidderivaten mit dem Polymeren auch aus den Infrarotspektren der erhaltenen Harze zu ersehen. Sowohl monomere als auch polymere Maleinimidverbindungen weisen bei etwa 830 cm^{-1} und bei 1710 cm^{-1} charakteristische Banden auf^{46,54,55}. Die Bande bei 1710 cm^{-1} ist den Carbonylgruppen des Imidringes zuzuordnen, während die Absorption bei 830 cm^{-1} durch die Schwingungen der

Abb.2. Zeitabhängigkeit des Umsatzes von Maleinimidoacetaldehyddimethylacetal mit dem mit 5 Molprozent Terephthalaldehyd vernetzten Poly(vinylalkohol)



Reaktionsbedingungen: 1,0 g vernetzter Poly(vinylalkohol) wurde in 100 cm³ Wasser und 2,0 cm³ konzentrierter Salzsäure bei 45°C mit 4,0 g Maleinimidoacetaldehyddimethylacetal zur Reaktion gebracht.

Vinylprotonen aus der Ringebene des Imids zustande kommt. Diese Bande verschwindet deshalb nach Reaktion des Maleinimids mit Thiolgruppen. Sie ist verschoben und wesentlich weniger intensiv, wenn der Imidring nicht geschlossen ist, also Derivate der Maleinsäure vorliegen.

Tabelle 3 zeigt zu Immobilisierungsreaktionen ausgewählte reaktive Träger, die auf der Basis von vernetztem Poly(vinylalkohol) entstanden sind. Alle aufgeführten Träger sind in 60-stündiger Reaktion des Maleinimidderivates mit dem vernetzten Poly(vinylalkohol) erhalten worden. Ihre unterschiedlichen Eigenschaften erlauben es, Immobilisierungsreaktionen in Abhängigkeit von der Quellbarkeit untersuchen zu können. Die Schüttvolumina dieser Polymeren sind im Bereich von pH 4 bis pH 12 vom pH-Wert unabhängig.

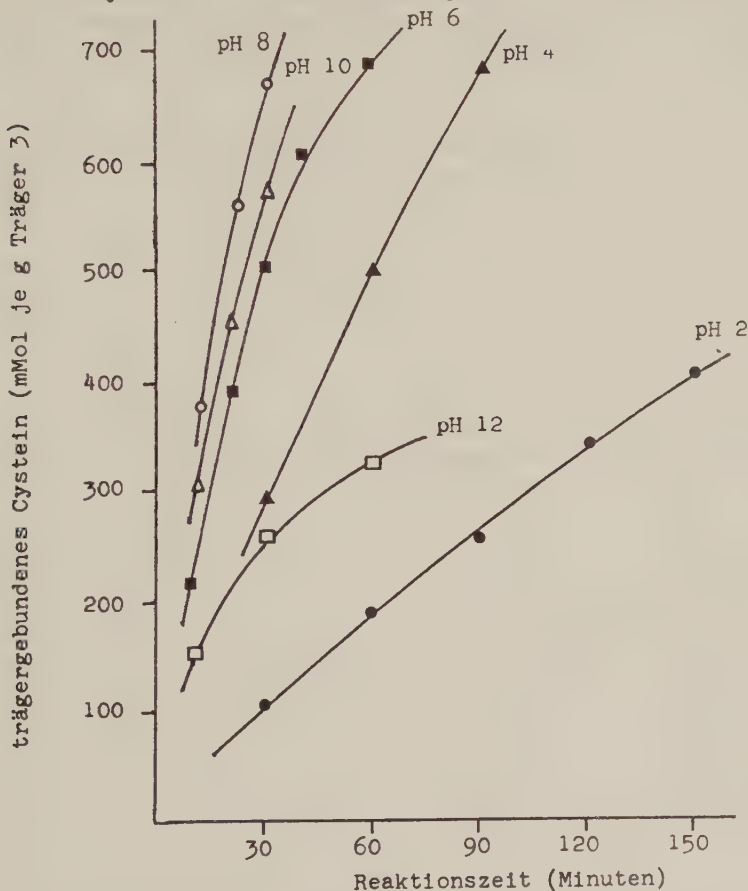
Tab.3.Ausgewählte reaktive Träger mit Maleinimidgruppen auf der Basis von vernetztem Poly(vinylalkohol)

Träger	Vernetzer- einsatz (Molproz.)	Stickstoff- gehalt (Prozent)	Gehalt an Male- inimidgruppen mMol.g ⁻¹)	Schüttvolumina nach Quellung in Wasser (cm ³ .g ⁻¹)
1	1,0	1,92	1,37	9,77
2	2,0	1,62	1,16	3,82
3	5,0	2,50	1,79	2,77

Das wichtigste Charakteristikum der Harze mit Maleinimidgruppen ist ihre Fähigkeit, mit Thiolgruppen zu reagieren. Bei den bisher dargestellten Polymeren wurde diese Reaktion mit der Aminosäure Cystein überprüft. Dabei sollte sowohl die Reaktionsgeschwindigkeit der maleinimidgruppenhaltigen Harze gemessen werden, als auch die Abhängigkeit der Bindung von Thiolgruppen vom pH-Wert des Reaktionsgemisches. Wegen der Zunahme der Thiolatanionen bei höheren pH-Werten und der Zunahme freier Aminogruppen wird sich die Reaktion des Maleinimids mit dem Cystein mit steigendem pH beschleunigen. Die unspezifische Reaktion mit Aminogruppen sollte erst unter pH 6 zum Stillstand kommen^{10,11,16}. Bei hohen pH-Werten wird aber andererseits die Menge der vorhandenen Maleinimidgruppen am Polymeren durch alkalische Hydrolyse zum Maleinsäureamid vermindert^{6,7}. Außer vom pH hängt diese Hydrolyse von den elektronenziehenden Eigenschaften der Substituenten am N-Atom des Imidringes und von der Temperatur ab. Die Untersuchung der SH-Addition an die Doppelbindung des Maleinimids wurde bei Raumtemperatur durchgeführt. Der pH-Wert der Reaktionsmischungen wurde durch Puffer konstant gehalten (Merck, Titrisol), zur Untersuchung wurde der Träger 3 verwendet. Die Aufnahme des Cysteins durch den Träger aus der Lösung wurde aus der Menge des nicht reagierten Cysteins photometrisch bestimmt^{56,118}. Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 3 und 4 zusammengestellt. Abbildung 3 zeigt die zeitliche Abhängigkeit der Umsetzung des Trägers 3 mit Cystein bei verschiedenen pH-Werten. Es ist eine deutliche Zunahme der Reak-

tionsgeschwindigkeit mit steigendem pH zu beobachten.

Abb.3. Zeitliche Abhängigkeit der Umsetzung des Trägers 3 mit Cystein bei verschiedenen pH-Werten



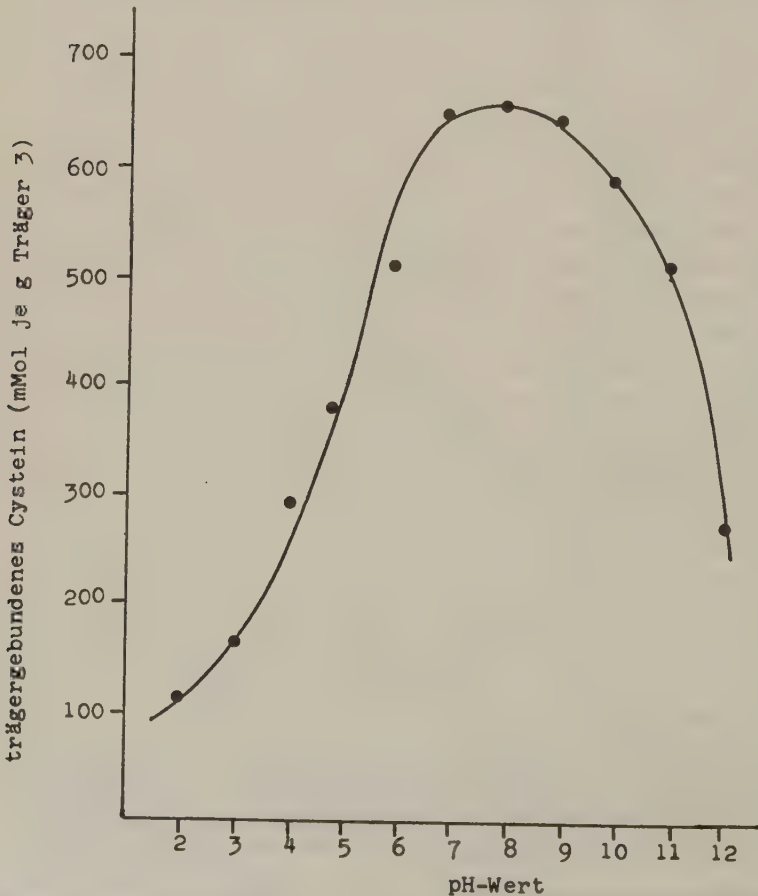
Reaktionsbedingungen:

20 cm³ Puffer (Merck, Titrisol) wurden mit 10 cm³ Cysteinlösung (120 mg Cystein) gemischt. In der Lösung wurden je etwa 110 mg Träger 3 suspendiert. Zurückgebliebenes Cystein wurde mit DTNB bei 412 nm quantitativ bestimmt.

Die Reaktion des Cysteins mit dem reaktiven Träger verlief bei pH 8 am schnellsten. Oberhalb dieses pH-Wertes nahm die Reaktionsgeschwindigkeit wieder ab. Während beim pH 2 die Abhängig-

keit der gebundenen Cysteinmenge eine lineare Funktion der Reaktionsdauer ist, ist bei höheren pH-Werten eine deutliche Krümmung zu geringerer Reaktionsgeschwindigkeit nach längerer Reaktionsdauer zu erkennen. Diese Abnahme der Menge an Cystein ist offensichtlich auf eine beginnende Hydrolyse der am Polymeren befindlichen Maleinimidgruppen zurückzuführen.

Abb.4. Menge des an Träger 3 gebundenen Cysteins bei verschiedenen pH-Werten innerhalb von 30 Minuten



Reaktionsbedingungen:

siehe Legende unter Abbildung 3. Reaktionsdauer hier 30 Minuten.

Die Darstellung in Abbildung 4 zeigt deutlich die Zunahme der gebundenen Cysteinmenge mit dem pH-Wert bis zum pH 7. Die Kurve wird dann unstetig und fällt ab pH 8 zunächst langsam, dann sehr steil ab. Aus der Literatur ist bekannt, daß die Reaktion von Thiolen mit Maleinimidgruppen in dem pH-Bereich unter 7 stattfinden muß, wenn sie spezifisch über die am zu bindenden Protein befindlichen Thiolgruppen erfolgen soll^{16,17}. Andererseits sollte der pH-Wert bei der Immobilisierungsreaktion möglichst hoch gewählt werden, um eine schnelle Bindung des Proteins zu gewährleisten. Oberhalb pH 10 ist es nicht mehr sinnvoll, mit diesem Harz eine Immobilisierungsreaktion durchzuführen. Abbildung 3 zeigt, daß die Reaktion des Cysteins mit den polymer gebundenen Maleinimidgruppen gegenüber monomerem Maleinimid stark verlangsamt ist: Während Maleinimid und seine Derivate im niedermolekularen Zustand in wenigen Minuten quantitativ mit SH-Verbindungen reagieren, ist die Reaktion am Polymeren selbst bei den günstigsten pH-Werten nach einer Stunde noch nicht abgeschlossen. So hat bei pH 8 nach etwa 40 Minuten erst etwa die Hälfte der zuvor am Polymeren befindlichen Maleinimidgruppen mit dem Cystein reagiert.

3.1.2. Poly(acrylnitril)

Eine weitere reaktive Trägersubstanz wurde auf der Basis von Poly(acrylnitril) dargestellt. Hier war es möglich, Polymere mit Schwammstruktur zu erzeugen. Mit N-Methylolmaleinimid bilden sich daraus neutrale, in Wasser nicht quellbare reaktive Harze. Durch Copolymerisation des Acrylnitrils mit anderen Monomeren lassen sich auch ionische Matrices bilden, die dann eine geringe Quellung in Wasser aufweisen können. An diesen Harzen läßt sich die Auswirkung der Schwammstruktur auf die Immobilisierung verschiedener Enzyme studieren.

3.1.2.1. Darstellung von Polymeren auf der Basis von Acrylnitril

Die Polymerisation des Acrylnitrils erfolgte radikalisch mit Azobisisobutyronitril als Starter. Mit einer Ausnahme war bei allen Polymeren 1,4-Divinylbenzol der Vernetzer. Es ist bei den hier verwendeten Bedingungen inert und braucht deshalb bei späteren Reaktionen der Polymeren nicht mehr berücksichtigt zu werden. Als dissoziierbares Comonomer wurde Acrylsäure gewählt. Ihr Dissoziationsgrad ist über den pH leicht einstellbar. Zugewetzte Lösungsmittel beim Polymerisationsansatz wie

Dioxan, m-Xylol oder Tetrachlormethan sollten die Polymerisationswärme besser ableiten helfen und verhindern, daß die Harzstruktur zu locker wird und daß die dargestellten Harze instabil werden. Die Polymerisationsreaktionen wurden unter Stickstoff in dickwandigen zugeschmolzenen Röhren aus Glas ausgeführt, welche nach dem Beschicken mit den Reaktionspartnern sorgfältig mit Stickstoff gespült wurden. Nach dem Abschmelzen polymerisierte der Inhalt bei 60°C im Ofen innerhalb von 24 Stunden. Nach dieser Zeit wurde das Polymerisationsrohr zerschlagen und der Inhalt einige Tage lang mit trockenem Dichlormethan extrahiert. Anschließend wurde das weiße Harz vorzerkleinert und unter trockenem Isododekan gemahlen, bis die Korngrößen kleiner als 0,2 mm waren. Ebenfalls unter Isododekan wurde dann das Material mit Abmessungen unter 0,1 mm ausgesiebt. Die gewünschte Kornfraktion mit Teilchengrößen zwischen 0,1 mm und 0,2 mm wurde bei Raumtemperatur im Vakuum über Paraffin vom Isododekan befreit. In Tabelle 4 sind die Polymerisationsansätze zusammengestellt. Die unterschiedlichen Ansätze wurden unternommen, um Veränderungen der Harzstruktur durch die verwendeten Lösungsmittel zu untersuchen. Die Acrylsäure war in der Lage, den Polymeren eine gelartige Konsistenz zu geben. Die Struktur der Copolymeren wurde durch sie stabiler und die Verluste als Staub beim Mahlen und Separieren geringer. Interessant sind die in Tabelle 4 mitgeführten Daten aus den Elementaranalysen der Harze. Obwohl alle Monomeren vor den Polymerisationsreaktionen destilliert worden waren, bildeten die Polymeren bei der Verbrennung einen Rückstand, der meist zwischen 0,5 Prozent und 1,5 Prozent der Harzeinwaage lag. Für weiterführende Aussagen, insbesondere um nach der Reaktion mit dem N-Methylolmaleinimid über die ins Harz eingeführte Menge an Sauerstoff aus dem Maleinimid den Umsetzungsgrad der Harze mit dem Maleinimiderivat berechnen zu können, eigneten sich die Analysen nicht, da in keinem Falle die Summe der Gewichtsprozente von Kohlenstoff-, Wasserstoff- und Stickstoffgehalt hundert Prozent ergab, was nach der Zusammensetzung der Harze erwartet werden würde. Die starke Streuung der Werte aus den Elementaranalysen ist aus den in der Tabelle für das Harz PAN 1 aufgeführten Werte zu erkennen.

Tab.4. Zusammenstellung der Polymerisationsansätze zur Darstellung von Poly(acrylnitril) und
Ergebnisse aus den Elementaranalysen

Harzbe- zeichnung	eingesetzte Mengen in g (mol)	1,4-Divinylbenzol	Comonomer	Menge	Art	Ausbeute (Proz.)	Elementaranalyse		
							C	H	N
PAN 1	7,54 (0,142)	1,85 (0,014)	--	5	Isododekan	62	68,04	5,97	17,18
							71,18	6,13	19,87
PAN 2	16,34 (0,308)	4,01 (0,031)	--	20	Tetrachlor- methan	64	69,24	5,87	19,61
							70,97	6,47	17,03
PAN 3	2,65 (0,050)	0,65 (0,005)	--	3	1,4-Dioxan	64	71,80	5,92	20,98
PAN 4	5,31 (0,100)	1,30 (0,010)	--		--	73	72,02	5,89	20,55
PAN 5	2,65 (0,050)	0,65 (0,005)	--	4	m-Xylol	66	71,75	5,95	21,02
PAN 6	5,31 (0,100)	1,42 (0,010) ^a	10,02 (0,100) ^b	15	1,4-Dioxan	70	69,61	8,88	11,69
PAN 7	10,61 (0,200)	2,60 (0,020)	14,41 (0,200) ^c		--	95	58,77	6,18	9,16
PAN 8	5,31 (0,100)	1,30 (0,010)	7,21 (0,100) ^c	15	1,4-Dioxan	93	59,29	6,34	9,20

a Vernetzer : 1,4-Butandioldivinylether

b Comonomer : n-Butylvinylether

c Comonomer : Acrylsäure

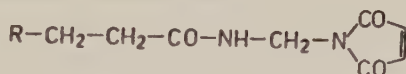
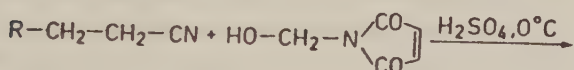
Die Polymeren mit Acrylsäure als Cokomponente waren im stark Alkalischen nicht stabil: In 1 M NaOH zerfielen sie nach einiger Zeit zu weißen, stark gequollenen Gelpartikeln. Für die weiteren Reaktionen mit N-Methylolmaleinimid wurden die Harze PAN 2 und 3 sowie PAN 6 bis 8 verwendet. PAN 7 und 8 unterschieden sich weder in ihren analytischen Daten noch in ihren mechanischen Eigenschaften. Ebenso war zwischen den Harzen PAN 2 und 3 kein gravierender Unterschied festzustellen. Das Polymere PAN 6 zeigte eine gummiartige Konsistenz. Es war nur sehr schwer zu bearbeiten, bildete aber als einziges Acrylnitril-Polymeres ein klares Gel.

Alle Infrarotspektren der Harze zeigten bei 2240 cm^{-1} die für die Nitrilgruppe charakteristische Bande. Die Harze mit Acrylsäure als Comonomerem zeigten außerdem bei 3170 cm^{-1} die Schwingungen für die OH-Gruppen und bei 1710 cm^{-1} jene für die Carbonylgruppen der Acrylsäure. Ebenso zeigte das Infrarotspektrum von dem Polymeren PAN 6 deutlich die Absorptionsbande für die Ethergruppen bei 1090 cm^{-1} .

Da alle auf der Basis von Acrylnitril dargestellten Polymeren mit Ausnahme der Harze PAN 6, 7 und 8 Schwammstruktur aufwiesen, wurde von den drei repräsentativen Harzen PAN 1, 2 und 4 das Volumen der im Harz vorhandenen Hohlräume bestimmt. Dazu wurden völlig trockene Harzstücke nach ihrer Extraktion mit Dichlormethan gewogen und dann mit Isododekan getränkt. Isododekan wurde dazu wegen seines hohen Siedepunktes gewählt, um fehlerhafte Messungen durch Verdunstungsverluste zu vermeiden. Je Gramm trockenes Harz nahm PAN 1 0,972 g Isododekan auf. Die Isododekanaufnahme von PAN 2 betrug 1,135 g je g und die von PAN 4 0,853 g je Gramm Harz. Die Volumina der Hohlräume in diesen Harzen unterschieden sich untereinander also nicht sehr stark. Bei einer effektiven Dichte der Polymeren von $1,55\text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$, gemessen durch Verdrängung von Isododekan, nahmen die Hohlräume etwa zwei Drittel des Harzvolumens ein. Diesen Berechnungen liegt eine Dichte des Isododekans von $0,743\text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$ zugrunde. Die Schüttvolumina der Harze PAN 1, PAN 2 und PAN 4 betrugen in trockenem Zustand $3,83\text{ cm}^3\cdot\text{g}^{-1}$.

3.1.2.2. Reaktionen der polymeren Nitrile mit N-Methylolmaleinimid

Nitrile reagieren in konzentrierter Schwefelsäure bei niedrigen Temperaturen mit N-Methylolmaleinimid²⁴. Diese Reaktion wurde zunächst mit N-Methylolmaleinimid und Propionsäurenitril und mit N-Methylolmaleinimid und 3-Brompropionsäurenitril durchgeführt und die Reaktionsprodukte untersucht:



Dazu wurden Äquimolare Mengen des jeweiligen Nitrils mit N-Methylolmaleinimid gemischt, das Gemisch bei 0°C mit kalter, konzentrierter Schwefelsäure versetzt und zwanzig Stunden unter Feuchtigkeitsausschluß gerührt. Im Falle des Propionsäurenitrils war die Reaktion stark exotherm. Die hochviskosen Lösungen wurden anschließend auf Eis gegossen. Die Reaktionsprodukte N-(Maleinimidomethyl)-3-bromcarboxamidopropan und N-(Maleinimidomethyl)-carboxamidopropan entstanden in Ausbeuten von 37,5 Prozent und 80,2 Prozent. Die aus den Elementaranalysen erhaltenen Werte entsprachen genau den Verbindungen $C_8H_9N_2O_3Br$ und $C_8H_{10}N_2O_3$. Die Infrarotspektren der beiden Verbindungen waren weitgehend identisch. Sie zeigten bei 3340 cm^{-1} die N-H-Valenzschwingung, bei 1705 cm^{-1} , 1540 cm^{-1} , 1430 cm^{-1} und 1335 cm^{-1} die für Carbonsäureamide typischen Schwingungen und bei 835 cm^{-1} und 695 cm^{-1} die Banden für die cis-ständigen Protonen des Maleinimidringes. Aus den Infrarotspektren der Verbindungen konnte aber nicht mit letzter Sicherheit bestimmt werden, ob es sich bei den dargestellten Verbindungen um die Carboxamidopropane oder die entsprechenden Iminoester handelte. Aufschluß über die Struktur gaben die 1H -NMR-Spektren der Substanzen. Das N-(Maleinimidomethyl)-3-bromcarboxamidopropan war in Aceton- d_6 und das N-(Maleinimidomethyl)-carboxamidopropan in DMSO- d_6 gelöst. Übereinstimmend erschien das Signal für die Pro-

tonen des Imidringes im Bereich von $\delta = 6,90$ bis $7,10$ ppm. Durch den Imidstickstoff erfolgte eine Verschiebung des Dubletts der Protonen der Methylengruppe zu tieferem Feld: $\delta = 4,70$ bis $5,00$ ppm. Es wurde eine typische Kopplung von 7 s^{-1} gemessen. Die Ethylgruppe des N-(Maleinimidomethyl)-carboxamidopropans war als Quartett bei $\delta = 1,90-2,30$ und als Triplet bei $\delta = 0,80-1,10$ ppm zu erkennen, die Methylengruppen des N-(Maleinimidomethyl)-3-bromcarboxamidopropans als Triplets bei $\delta = 3,50-3,70$ ppm und $\delta = 2,70-2,90$ ppm. Auch bei diesen Gruppen wurden typische Kopplungskonstanten von 7 s^{-1} gemessen. Die Signale der am Amidstickstoff gebundenen Protonen wurden bei $\delta = 8,37$ ppm und für das Bromderivat bei $\delta = 7,6$ ppm bis $7,9$ ppm als schwache Hügel ausfindig gemacht. Die ^1H -NMR-Spektren beweisen also eindeutig die Carboxamid-Struktur der dargestellten Verbindungen.

Die aus N-Methylolmaleinimid und den Nitrilen gebildeten Amide waren die einzigen Reaktionsprodukte, die dünnschichtchromatografisch in den Reaktionsansätzen nachgewiesen werden konnten. Chromatografiert wurde auf Kieselgel/Kieselgur-Platten in einem Gemisch von Toluol und Ethanol (3:1 v/v) als Laufmittel. Die Chromatogramme wurden mit Ioddampf entwickelt. Bei diesen Untersuchungen zeigte es sich, daß in Abwesenheit des Nitrils aus dem N-Methylolmaleinimid unter denselben Reaktionsbedingungen schon nach einer Stunde Reaktionszeit in 59-prozentiger Ausbeute der Bis-(maleinimidomethyl)-ether entstand. Er wurde über seinen Schmelzpunkt (Schmp. 133°C , Lit.: 132°C^{43}) und sein ^1H -NMR-Spektrum identifiziert: $\delta = 6,67$ ppm (4H, s) und $\delta = 5,03$ ppm (4H, s) in Chloroform-d. Seine Elementaranalyse ergab das theoretische CHNO -Verhältnis. Wird andererseits das Nitril mit konzentrierter Schwefelsäure ohne Anwesenheit von N-Methylolmaleinimid behandelt, so ist durch die geringe Menge Wasser in der Schwefelsäure eine geringe Hydrolyse des Nitrils zur entsprechenden Carbonsäure zu beobachten gewesen. Allerdings war ein unvernetztes Poly(acrylnitril), welches durch anionische Polymerisation von Acrylnitril in N,N-Dimethylformamid mit Natriumcyanid als Starter bei -50°C erhalten wurde, bereits nach vier Stunden Reaktionszeit mit 96-prozentiger Schwefelsäure bei 0°C durch Hydrolyse der Nitrilgruppen vollständig in Wasser löslich geworden. Bei

den vernetzten Harzen konnte allerdings keine Zunahme der Quellung durch diesen Effekt erkannt werden. Sie wurden wie die niedermolekularen Nitrile unter Rühren bei 0°C in konzentrierter Schwefelsäure mit N-Methylolmaleinimid umgesetzt. Ein Gramm Harz (zum Beispiel PAN 2 mit $15,1 \text{ mMol}$ Nitrilgruppen je Gramm) wurde mit etwa zwei Gramm ($15,7 \text{ mMol}$) N-Methylolmaleinimid zur Reaktion gebracht. Am Ende der Reaktion wurde die Mischung schnell in Eiswasser gegossen und dabei sehr stark gerührt, um lokale Erwärmung zu vermeiden. Das Polymere wurde dann mit Wasser gewaschen, bis es neutral reagierte, das Wasser mit Aceton verdrängt und das Harz anschließend an der Luft getrocknet. Alle Harze zeigten nach der Umsetzung mit N-Methylolmaleinimid mit Cystein und 1 M Natronlauge einen positiven Farbttest auf Maleinimidgruppen. Alle Harze zeigten auch nach der Reaktion mit N-Methylolmaleinimid eine Gewichtszunahme.

Um die Zeitabhängigkeit der Reaktion der polymeren Nitrile mit dem Maleinimiddervivat zu untersuchen, wurden dreizehn Reaktionsansätze unter genau den gleichen Bedingungen mit PAN 2 als Ausgangspolymer durchgeführt und nach verschiedenen langen Reaktionszeiten abgebrochen. Da aus den Elementaranalysen der erhaltenen Harze über die Anzahl der eingeführten Maleinimidgruppen keine Aussagen gemacht werden konnten, wurden die entstandenen reaktiven Harze mit Cystein umgesetzt und das nicht verbrauchte Cystein mit DTNB photometrisch bestimmt⁵⁶. Dazu wurden jeweils etwa 50 mg des zu untersuchenden Harzes mit $5,00 \text{ cm}^3$ Cysteinlösung ($30,1 \text{ mg}$ Cystein, $\text{pH } 6,0$) 90 Minuten lang umgesetzt, die Harze abfiltriert und auf genau 100 cm^3 mit Wasser gewaschen. Der Cysteingehalt dieser Lösungen wurde dann mit DTNB bei 412 nm im Photometer vermessen. Tabelle 5 zeigt die Ergebnisse dieser Messungen. Hier sind auch die aus den Elementaranalysen erhaltenen Werte mit aufgeführt. Es hat sich gezeigt, daß nach 20-minütiger Reaktionszeit der polymeren Nitrile mit dem N-Methylolmaleinimid keine weitere Änderung der Menge der ins Harz eingeführten Maleinimidgruppen zu erreichen war. Bereits nach dieser Zeit enthält das Harz $1,83 \text{ mMol} \cdot \text{g}^{-1}$ Maleinimidgruppen, nach 70 Stunden Reaktionszeit $2,15 \text{ mMol} \cdot \text{g}^{-1}$.

Tab.5. Zeitliche Abhängigkeit der Reaktion von N-Methylolmaleinimid mit PAN 2

Reaktionszeit (Minuten)	Werte aus der Elementaranalyse				Maleinimidgehalt (mmol·g ⁻¹) ^b
	C	H	N Rückst. ^a		
10	61,54	5,37	15,29	0,00	1,64
20	60,20	5,38	15,18	1,34	1,83
30	57,82	5,34	13,84	0,00	1,94
	60,57	5,60	14,28	0,75	1,91
40	60,21	5,72	14,56	0,51	2,01
50	60,49	5,57	14,21	0,39	1,95
60	57,74	6,07	13,52	0,61	2,03
	60,10	5,60	14,28	0,67	1,92
120	62,01	5,68	14,93	1,12	1,95
240	57,44	5,43	13,70	1,08	1,85
360	57,60	5,57	13,74	1,37	2,02
1440	54,99	5,45	13,01	2,55	2,10
4200	57,11	5,67	13,39	2,95	2,15

a: Rückstandsangaben in Prozent der Einwaage der Polymeren bei der Elementaranalyse

b: Bestimmung der Maleinimidgruppen: Je etwa 50 mg des Polymeren wurden in 5,00 cm³ Cysteinlösung (entspr. 30 mg Cystein) bei pH 6,0 für 90 Minuten suspendiert. Zurückgebliebenes Cystein wurde dann nach Ellman bestimmt⁵⁶.

3.1.2.3. Charakterisierung der maleinimidhaltigen Polymeren auf der Basis von Poly(acrylnitril)

Die reaktiven Harze auf der Basis von Poly(acrylnitril) sind reinweiße Polymere. Wurde beim Waschen der Harze mit Wasser nach der Reaktion in konzentrierter Schwefelsäure nicht schnell genug gearbeitet, entstanden bisweilen auch inhomogene, sandfarbene Produkte, die verworfen werden mußten. Alle maleinimidgruppenhaltigen Harze wurden mit Bariumchlorid auf noch im Träger vorhandenes Sulfat geprüft. Dazu wurde sowohl der wässrige Extrakt eines jeden Trägers als auch ein Natriumaufschluß mit Bariumchlorid geprüft und, sofern noch Sulfat nachzuweisen war, die Extraktion mit Wasser fortgesetzt. Tabelle 6 zeigt die nach der Reaktion mit N-Methylolmaleinimid erhaltenen Träger. An den aufgeführten Trägern fällt der relativ geringe Maleinimidgruppengehalt der Träger 7

Tab.6.Reaktive maleinimidgeuppenhaltige Träger auf der Basis von

Poly(acrylnitril)

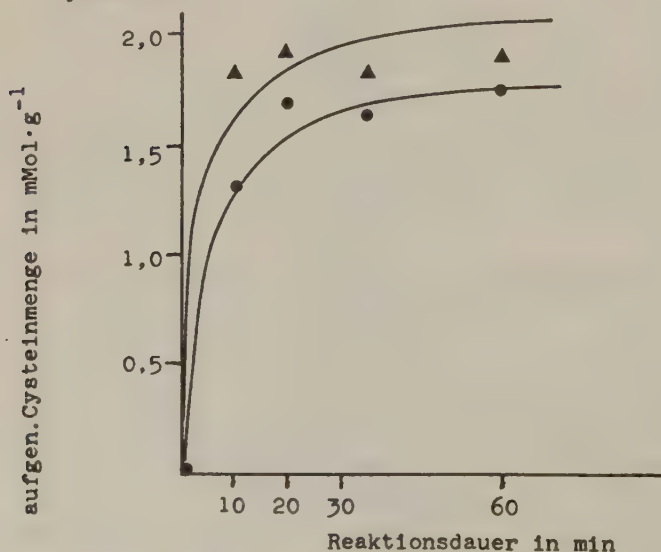
Träger Ausgangs- Reaktions- Elementaranalytische Daten Maleinimidgehalt		N Rückst. ^a (mmol·g ⁻¹) ^b			
polymer	zeit (h)	C	H		
5 PAN 3	24	54,99	5,45	13,01	2,95
6 PAN 3	25	55,80	5,57	13,08	1,45
7 PAN 6	3	56,72	6,82	6,41	1,92
8 PAN 7	4	50,29	5,73	7,44	6,23
9 PAN 8	4	52,12	6,49	8,23	0,70
					1,73

a: Rückstandsangaben in Gewichtsprozenten der Polymeren

b: Bestimmung der Maleinimidgruppen: Je etwa 50 mg des Polymeren wurden in 5,00 cm³ Cysteineinlösung (entspr. 30 mg Cystein) bei Raumtemperatur und pH 6,0 für 90 Minuten suspendiert. Die Menge des nicht reagierten Cysteins wurde nach Ellman bestimmt⁵⁶.

und 8 im Verhältnis zu den anderen Trägern auf, die alle etwa $2 \text{ mmol} \cdot \text{g}^{-1}$ Maleinimidgruppen trugen. Dies wird durch den Gelcharakter von PAN 6 und 7 hervorgerufen, aus denen diese Träger entstanden sind: Das Copolymer mit Butylvinylether ist ein klares Gel (PAN 6). Dioxan bei der Polymerisation von PAN 8 bewirkte, daß die Harzstruktur aufgelockert wurde und das Harz im Vergleich mit PAN 7 besser erreichbar ist. Die Geschwindigkeit der Reaktion des neutralen Trägers 5 und des sauren Trägers 9 mit Cystein wurde bei verschiedenen pH-Werten untersucht. Dazu wurden je etwa 50 mg des Trägers (Korngröße 0,10 mm - 0,20 mm) mit einer Lösung von 30,10 mg Cystein in $5,00 \text{ cm}^3$ Titrisol-Puffer geschüttelt und nach zehn, zwanzig, dreißig und sechzig Minuten die Lösung mit einer Stieltfritte abgesaugt und das Harz gewaschen, bis die Lösung ein Volumen von 100 cm^3 erreicht hatte.

Abb.5. Bindung von Cystein durch den Träger 5 bei verschiedenen pH-Werten



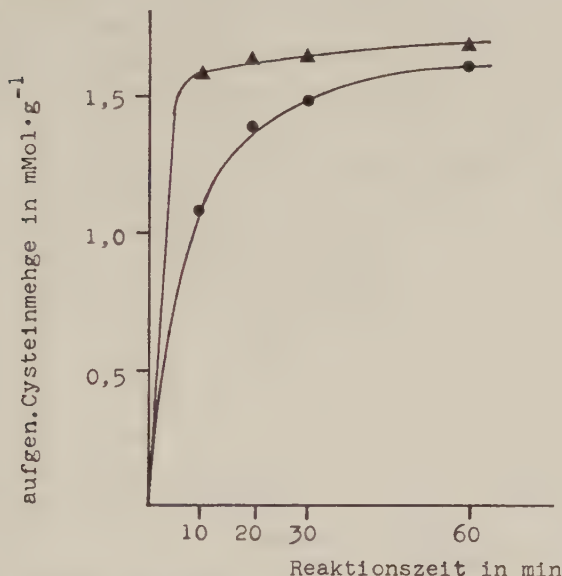
Reaktionsbedingungen:

Je etwa 50 mg Träger 5 wurden mit $5,00 \text{ cm}^3$ Cysteinlösung (entspr. 30,10 mg Cystein) geschüttelt. Nichtgebundenes Cystein wurde mit DTNB bestimmt.

● pH 4,0

▲ pH 8,0

Abb.6. Bindung von Cystein durch den Träger 9 bei verschiedenen pH-Werten



Reaktionsbedingungen:

Je etwa 50 mg Träger 9 wurden mit 5,00 cm³ Cysteinlösung (entspr. 30,10 mg Cystein) geschüttelt. Nichtgebundenes Cystein wurde mit DTNB bestimmt⁵⁶.

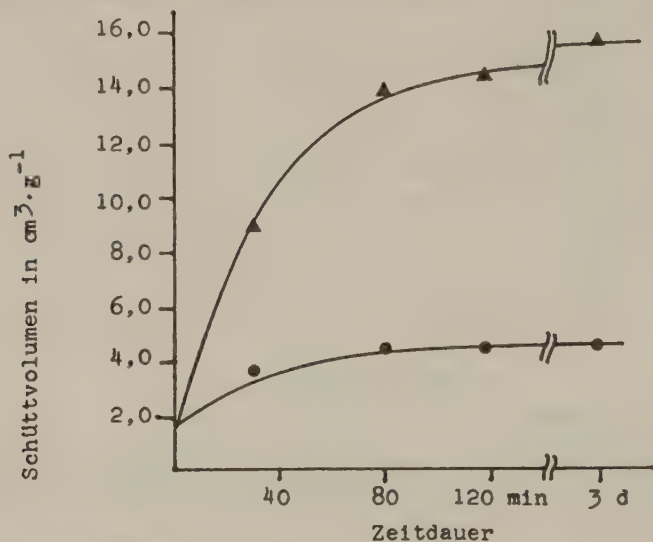
● pH 4,0 ▲ pH 8,0

In dieser Lösung wurde das verbliebene Cystein mit DTNB optisch bestimmt. Das Ergebnis dieser Untersuchungen ist in den Abbildungen 5 und 6 zu erkennen.

Die Bindung von Cystein verläuft schnell und ist bei höheren pH-Werten nach einer Stunde abgeschlossen. Die Reaktion wurde für die pH-Werte 4,0, 6,0, 8,0 und 10,0 untersucht. Beim pH 4,0 verläuft sie etwas langsamer, als bei den anderen pH-Werten, die untereinander fast identisch sind. Deshalb wurden in den Abbildungen 5 und 6 nur die Reaktionen bei den pH-Werten 4,0 und 8,0 aufgeführt. Der saure Träger 9 reagiert deutlich schneller als Träger 5, da er in Wasser gut quellbar ist und die gebundenen Maleinimidgruppen vom Cystein besser erreichbar sind: Die Polymeren PAN 1 bis PAN 5 und die Träger 5 bis 7 quellen in Wasser bei pH 6 auch nach drei Tagen noch nicht meßbar, während die Copolymeren mit Acrylsäure eine pH-Abhängigkeit ihrer Quellung aufwiesen. Für die Harze PAN 7 und PAN 8 wurde zunächst die Quel-

lungsgeschwindigkeit bei pH 6,0 untersucht. Dabei zeigte es sich, daß die Quellung nach etwa zwei Stunden abgeschlossen war. Die Abbildung 7 zeigt die fortschreitende Quellung von PAN 7 und 8. Die Abhängigkeit der Quellungen vom pH-Wert ist in Tabelle 7 dargestellt. Der Träger 8 ist aus PAN 7 und Träger 9 aus PAN 8 entstanden.

Abb.7. Zeitlicher Verlauf der Quellung von PAN 7 und 8 bei pH 6.0



Quellungsmessung:

0,10 cm³ PAN 7 (●) und PAN 8 (▲) wurden im graduierten Rohr (Durchmesser 5,0 mm) mit Puffer pH 6,0 (Titrisol) versetzt.

Tab.7. Auswirkung des pH-Wertes auf die Schüttvolumina der Träger 8 und 9 sowie der Harze PAN 7 und PAN 8 in Wasser

Harzbezeichnung	Schüttvolumina in cm³·g⁻¹					
	trocken	pH 2,0	pH 4,0	pH 6,0	pH 8,0	pH 10,0 ^a
PAN 7	2,181	3,490	3,372	5,016	5,234	5,234
Träger 8	2,212	3,538	3,538	4,865	5,308	5,308
PAN 8	1,820	2,912	2,912	14,196	19,110	24,570
Träger 9	1,466	1,880	2,169	4,917	7,519	8,965

a: Die pH-Werte wurden mit Titrisol-Puffern (Merck) eingestellt.

Bis pH 4 ist eine geringe, nur wenig mit dem pH ansteigende Quellung zu beobachten. Oberhalb pH 4 steigt dann die Quellung mit fortschreitender Dissoziation der Carboxylgruppen stark an. Beim geringer quellenden Träger 8 wirken sich die Maleinimidgruppen nicht auf die Quellung aus, aber beim Träger 9 ist die Quellung nach Umsetzung mit dem N-Methylolmaleinimid gegenüber dem Polymeren PAN 8 auf die Hälfte zurückgegangen. Eine Unstetigkeit der Quellungskurven, die durch Hydrolyse der Maleinimidgruppen hervorgerufen werden könnte, wurde bei pH 12 nicht beobachtet. Selbst bei wochenlanger Lagerung in Puffer pH 6 konnte mittels Titration mit Cystein kein Verlust von Maleinimidgruppen an den Trägern 5 bis 8 beobachtet werden.

Sowohl bei den Polymeren als auch beim N-(Maleinimidomethyl)-carboxamidopropan war der intakte Maleinimidring über den Farbttest durch Versetzen mit Cystein und nachfolgendes Erhöhen des pH gut zu erkennen, ebenso wie aus den Infrarotspektren der Substanzen an den Banden bei 830 cm^{-1} und 695 cm^{-1} für die Schwingungen der cis-ständigen Protonen an der Imid-Doppelbindung. Bei den mit N-Methylolmaleinimid umgesetzten Harzen war die Intensität der Nitrilbanden (2240 cm^{-1} und 1455 cm^{-1}) stark zurückgegangen oder diese Banden waren sogar ganz verschwunden. Bei den Harzen, die nicht mit Acrylsäure copolymerisiert worden waren, konnten bei 1670 cm^{-1} die C=O-Gruppen des Imids und der Carboxamidgruppe als intensive und breite neue Banden beobachtet werden. Besonders schön waren die Veränderungen im Infrarotspektrum nach der Reaktion mit N-Methylolmaleinimid beim unvernetzten Poly(acrylnitril) zu erkennen. Es konnte aber auch am Harz, wie schon bei den monomeren Nitrilen festgestellt, eine schnelle Hydrolyse der Nitrilgruppen erreicht werden, wenn bei der Reaktion in konzentrierter Schwefelsäure das N-Methylolmaleinimid fortgelassen wurde: Die Nitrilbanden verloren an Intensität, gleichzeitig entstanden neue Absorptionsbanden bei 3390 cm^{-1} und 1670 cm^{-1} . Auch am Polymeren geht diese Hydrolyse der Nitrilgruppen relativ schnell vonstatten. Bereits nach vierstündiger Reaktionszeit des Harzes PAN 3 in konzentrierter Schwefelsäure unter Feuchtigkeitsausschluß bei 0°C konnte nach

Auswaschen mit Wasser die Nitrilbande im Infrarotspektrum kaum noch ausgemacht werden. Die Infrarotspektren der Träger 5 bis 9 zeigten deutlich, daß eine Verknüpfung des N-Methylolmaleinimids mit den Harzen PAN 2, PAN 3 und PAN 6 bis PAN 8 erfolgt ist und daß diese Verknüpfung über die vorher an den Polymeren vorhandenen Nitrilgruppen erfolgt ist.

3.1.3. Polymere mit Thiolgruppen

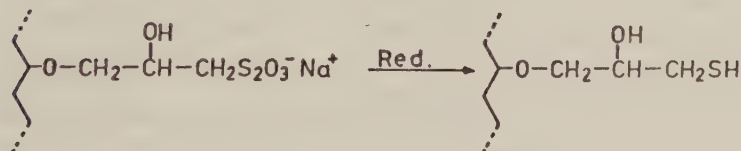
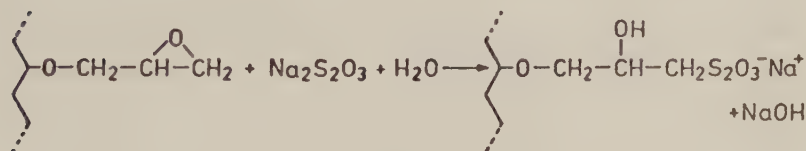
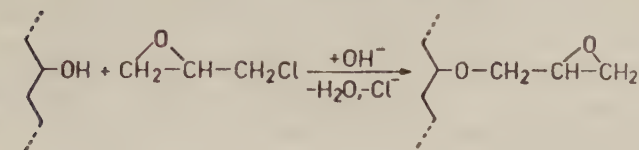
Wasserunlösliche Polymere mit freien, kovalent gebundenen Thiolgruppen haben in letzter Zeit an Bedeutung gewonnen^{30,57-63}. Sie erlauben es, über Disulfidbrücken andere Thiolgruppen zu binden. Diese Reaktion geht unter sehr milden Bedingungen vonstatten und ist ebenfalls unter schonenden Bedingungen reversibel. Dadurch ergibt sich die Möglichkeit, mit solchen Harzen selektiv SH-haltige Substanzen von anderen Stoffen ohne diese Gruppen abzutrennen^{58,59,61,63}. Ebenso können thiolgruppenhaltige Reagenzien an solche Polymere über Disulfidbrücken gebunden werden. Diese Reagenzien können weitere Substanzen, zum Beispiel Proteine binden. Spaltet man jetzt reduktiv die Disulfidgruppierung, so erhält man Produkte mit freien SH-Gruppen. Solche "bifunktionellen" Reagenzien können zur Thiolierung von Eiweiß verwendet werden; das vom polymeren Träger abgetrennte Protein trägt dann mit Sicherheit mindestens eine Thiolgruppe und bildet nicht, wie nach der Thiolierung mit niedermolekularen Thiolierungsreagenzien, ein statistisches Gemisch von thiolisiertem und nicht thiolisiertem Protein^{30,62}. An die Polymeren mit Thiolgruppen können außerdem Proteine gebunden werden, die mit Maleinimidverbindungen zuvor derivatisiert worden sind.

In dieser Arbeit wurden als thiolgruppenhaltige Träger neutrale, in Wasser gut quellbare Harze auf der Basis von Agarose und Poly(vinylalkohol) verwendet.

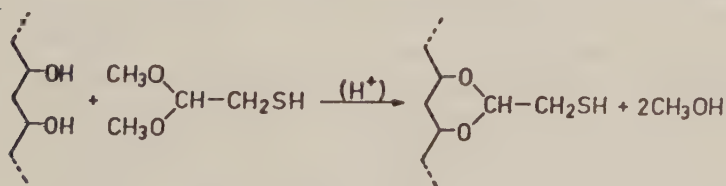
3.1.3.1. Darstellung thiolgruppenhaltiger Träger

Von den diversen Möglichkeiten, Harze mit SH-Gruppen zu synthetisieren wurden in dieser Arbeit zwei verwendet, die von einer fertigen Polymermatrix ausgehen und diese modifizieren. Durch Reaktion hydroxylgruppenhaltiger Harze mit Epichlorhydrin in basischer Umgebung, nachfolgende Reaktion mit Natriumthiosulfat und Reduktion zur Thiolgruppe war eine polymer gebundene

2-Hydroxy-3-thiopropylgruppe zugänglich^{57,62}:



Diese Reaktion wurde mit Sephadex G25, Sepharose 4B und vernetzten Harzen auf Poly(vinylalkohol)-Basis durchgeführt. Harze aus Poly(vinylalkohol) konnten außerdem mit 2-Mercaptoacetaldehyddimethylacetal umgesetzt werden:



Als Ausgangspolymere wurden zu dieser Reaktion der zu einem, zu zwei und zu fünf Molprozent mit Terephthalaldehyd vernetzte Poly(vinylalkohol) verwendet. Das 2-Mercaptoacetaldehyddimethylacetal wurde durch Bromierung von Vinylacetat, Behandeln des Produkts mit Methanol, Substitution des Broms mit Natriumdisulfid und Reduktion des entstandenen Polysulfids mit Lithiumaluminiumhydrid gewonnen^{64,65}.

Die Träger 10 bis 12 wurden auf folgende Weise dargestellt: 2,0 g des vernetzten Poly(vinylalkohol)s wurden in Wasser vorgequollen und nach Ansäuern mit Salzsäure mit 3,0 g (23.8 mmol) 2-Mercaptoacetaldehyddimethylacetal 60 Stunden bei etwa 50°C reagieren gelassen. Danach wurde abgesaugt, mit Aceton extrahiert und nach dem Trocknen nochmals auf Korngrößen von 0,100 mm bis 0,200 mm separiert.

Die Träger 13 bis 17 entstanden durch Behandeln hydroxylgruppenhaltiger Harze mit Epichlorhydrin in Natronlauge bei 60°C. Das von Natronlauge und Epichlorhydrin freigewaschene Polymer wurde anschließend mit Phosphatpuffer äquilibriert und 24 Stunden mit Natriumthiosulfat zur Reaktion gebracht. Innerhalb einer Stunde wurde das so entstandene Harz mit 2-Mercaptoethanol in Hydrogencarbonatlösung zur SH-Verbindung reduziert.

3.1.3.2. Charakterisierung der thiolgruppenhaltigen Polymeren

Alle dargestellten thiolgruppenhaltigen Harze sind in Tabelle 8 aufgeführt. Die aus der Reaktion mit 2-Mercaptoacetaldehyddimethylacetal entstandenen Träger 10 bis 12 zeigten eine hohe Zunahme ihres Gewichtes nach der Reaktion. Sie betrug beim Träger 10 etwa 70 Prozent und beim Träger 12 noch 22 Prozent. Die beobachteten Gewichtszunahmen stimmten aber mit den niedrigen, mit DTNB-Titration gefundenen Mengen freier Thiolgruppen der Träger nicht überein. Dies ist wahrscheinlich auf die intermolekulare Mercaptalbildung zwischen den Molekülen des 2-Mercaptoacetaldehyds im sauren Milieu zurückzuführen⁶⁵. Die so entstandenen kurzkettigen Reaktionsprodukte reagieren dann mit dem Poly(vinylalkohol) und führen trotz einer hohen Gewichtszunahme zu nur wenigen freien SH-Gruppen. Die Ketten des polymeren Thioacetals bewirken, wahrscheinlich durch Abschirmung der Hydroxylgruppen des Poly(vinylalkohol)s, einen starken Rückgang der Quellung in Wasser. Je mehr das Gewicht der Harze durch die Acetalisierung zunahm, umso stärker war der Rückgang der Quellung. Die höchste Zunahme des Schüttvolumens bei der Quellung in Wasser wies das mit zwei Molprozent mit Terephthalaldehyd vernetzte Harz auf (Träger 11). Die Quellung der Träger 10 bis 12 in Wasser ist nach etwa zwanzig Minuten abgeschlossen und ist vom pH-Wert unabhängig. Die Träger 10-12 zeigten ihre Insta-

Tab.8. Hydrophile Träger mit freien Thiolgruppen

Träger	Ausgangs- polymer	Vernetzereinsatz in Molprozent	reaktive Gruppierung	Schüttvolumina (cm ³ ·g ⁻¹) trocken in Wasser	Quellungs- faktor	SH-Gruppen (mmol·g ⁻¹)
10	Poly(vinyl- alkohol)	1,0	$\begin{array}{c} \text{—O—} \\ \text{—O—} \end{array} \text{CH—CH}_2\text{SH}$	1,799	1,60	0,139
11	"	2,0	"	1,780	2,50	0,202
12	"	5,0	"	2,716	1,79	0,078
13		1,0	$\begin{array}{c} \text{OH} \\ \\ \text{—O—CH}_2\text{—CH—CH}_2\text{SH} \end{array}$	1,508	4,41	0,323
14	"	2,0	"	1,718	1,80	0,215
15	"	5,0	"	2,617	1,60	0,204
16	Sephарose 4B	---	"	2,411	25,0	0,440
17	Sephadex G50	---	"	1,205	3,40	0,155

a: Bei diesen Polymeren war die Quellung vom pH-Wert abhängig.

bilität durch eine andauernde Abgabe von Mercaptoacetaldehyd, was am Geruch der Harze deutlich zu erkennen war. Wegen dieser Instabilität der Träger 10 bis 12 waren sie zur Immobilisierung nicht gut geeignet.

Die Träger 13 bis 15 enthielten freie SH-Gruppen in der Größenordnung von etwa 0,25 mMol je Gramm. Träger 13 mit der höchsten Quellbarkeit vor der Reaktion zum polymeren Thiol weist den höchsten Thiolgruppengehalt auf. Auch der elementaranalytisch ermittelte Schwefelgehalt war mit 2,10 Gewichtsprozenten bei diesem Träger am größten.

Die Reduktion der Polymeren zu SH-haltigen Trägern wurde ausser mit 2-Mercaptoethanol auch mit Dithiothreitol und Natriumtetrahydridoboratan versucht. Da hierbei der gleiche SH-Gehalt erreicht wurde, wie bei der Reduktion mit dem Mercaptoethanol, kann als sicher angesehen werden, daß Mercaptoethanol zur Reduktion zu SH-Gruppen ausreichend ist.

Die Quellung der Träger 13, 14 und 15 war vom pH-Wert des Quellungsmittels abhängig. Mit steigendem pH-Wert wurde eine deutliche Zunahme der Schüttvolumina der Harze beobachtet. In Tabelle 9 sind die Schüttvolumina der Träger 14 und 15 in Wasser sowie in zwei verschiedenen Puffern (Titrisol, Merck) aufgeführt. In Abbildung 8 ist das Quellungsverhalten des wesentlich besser quellbaren Trägers 13 aufgeführt.

Tab.9. Schüttvolumina der Träger 14 und 15

Träger	Schüttvolumina in $\text{cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$			
	trocken	in Wasser	bei pH 2,0	bei pH 9,0
14	1,718	3,092	3,436	4,123
15	2,617	4,187	4,449	4,710

Messung der Schüttvolumina:

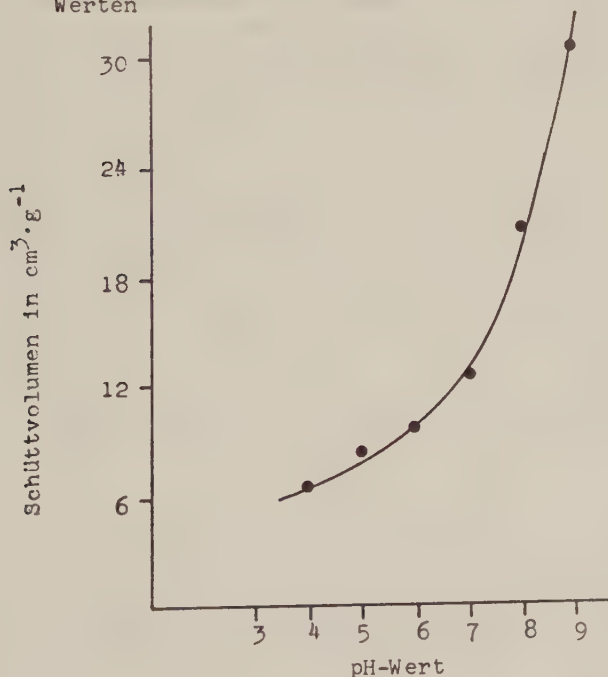
Im graduierten Rohr wurde eine genau ausgewogene Menge des Trägers mit dem jeweiligen Medium versetzt und das Volumen des Trägers nach beendeter Volumenzunahme abgelesen (Rohrdurchmesser 0,50 cm).

Die Steigerung der Quellung bei hohen pH-Werten ist durch die Dissoziation der SH-Gruppen in Thiolat-Anionen zu erklären. Alle gemessenen Werte der Schüttvolumina fielen auf die alten

Werte zurück, wenn nach den Messungen von hohen pH-Werten auf niedrige zurückgegangen wurde.

Die Träger 16 und 17 wurden ebenfalls, wie die Träger 13 bis 15, durch Reduktion der entsprechenden Thiosulfate gewonnen. Der aus Sepharose gewonnene Träger 16 erreichte wegen seiner außerordentlich hohen Quellbarkeit den verhältnismäßig hohen Thiolgruppengehalt von 0,440 mmol je Gramm. Der auf Basis von Poly(vinylalkohol) aufgebaute Träger 13 zeigte jedoch einen doppelt so hohen SH-Gehalt, wie der aus Sephadex G50 aufgebaute Träger 17 bei gleich guter Quellung in Wasser.

Abb.8. Schüttvolumina des Trägers 13 bei verschiedenen pH-Werten



Messung der Schüttvolumina:

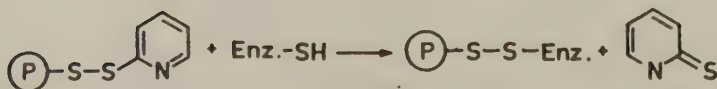
0,10 cm³ Harz wurden in einem graduierten Rohr (Durchmesser 0,50 cm) mit verschiedenen Puffern äquilibriert und dann das Harzvolumen abgelesen. Puffer: Titrisol, Merck.

Die Infrarotspektren der SH-haltigen Träger zeigten mit Ausnahme von Träger 16 wegen der geringen Mengen an Thiolgruppen nicht die für Thiole charakteristische Bande bei 2630 cm⁻¹. Die chemische Ähnlichkeit aller Träger war aber gut aus den

Spektren abzulesen: Alle zeigten bei etwa 3330 cm^{-1} Banden für Hydroxyl-, bei 2900 cm^{-1} für Methylen- und bei 1100 cm^{-1} für Ethergruppen. Größere Unterschiede waren nur zwischen den aus Poly(vinylalkohol) aufgebauten Trägern und den aus Agarsederivaten entstandenen Trägern zu erkennen. Letztere zeigten eine sehr breite Bande im Bereich von 1000 cm^{-1} bis 1180 cm^{-1} und für die 1,6-glycosidisch verknüpften Glucoseinheiten eine Bande bei 770 cm^{-1} .

3.1.3.3. Aktivierung der thiolgruppenhaltigen Träger

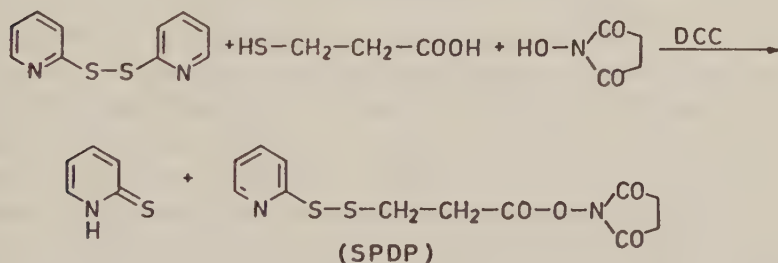
Träger mit Thiolgruppen können Proteine, in die man eine Maleimidgruppe eingeführt hat, immobilisieren. Sollen sie aber SH-haltige Proteine binden oder Proteine ohne freie SH-Gruppen thiolieren, so müssen sie zuerst modifiziert werden. In dieser Arbeit wurden bekannte Methoden zur Modifizierung verwendet^{30,58-63}: Damit die Harze mit thiolgruppenhaltigen Proteinen reagieren können, wurden sie mit 2,2'-Dipyridyldisulfid zum gemischten Disulfid umgesetzt, welches dann mit den SH-haltigen Proteinen in einem Disulfidwechsel reagiert. 2-Thiopyridon wird dabei abgegeben und erlaubt durch seine Farbe, die Bindung des Proteins ans Polymere bei 343 nm optisch quantitativ zu verfolgen:



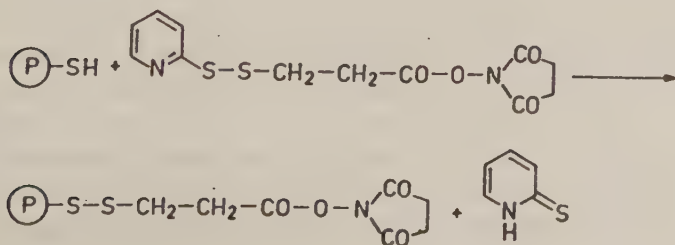
Mit einem Reduktionsmittel (zum Beispiel Dithiothreitol, DTT) läßt sich bei Bedarf das Eiweiß wieder vom Harz lösen. Das Harz kann auf diese Weise zu einer neuen Immobilisierung oder Enzymbereinigung nach vorheriger Aktivierung mit 2,2'-Dipyridyldisulfid wiederverwendet werden. Die Immobilisierungsreaktionen lassen sich sowohl in einer Säule, die mit dem reaktiven Harz gepackt ist, als auch im "batch"-Verfahren durch-

führen. In dieser Arbeit wurde der Säule der Vorzug gegeben, da dabei kontinuierlich gearbeitet werden konnte und auf die Reaktion der SH-Gruppen mit dem Luftsauerstoff keine große Rücksicht genommen zu werden brauchte. Das Eluat aus den Säulen wurde durch eine 0,100 cm-Quarzküvette geleitet. Hier konnte sowohl die optische Dichte der Enzymlösung bei 280 nm als auch entstandenes 2-Thiopyridon bei 343 nm registriert werden.

N-Succinimidyl-3-thiopropionat diente als Thiolierungsreagenz. Es kann mit Aminogruppen in Proteinen zum Amid reagieren. Meist wird die Thiolgruppe dieser Substanz mit 2-Thiopyridon zum Disulfid umgesetzt und so gegen unerwünschte Reaktionen mit anderen SH-Gruppen oder Disulfidgruppen im Protein oder gegen Oxidation durch Luftsauerstoff geschützt^{30,62}. Dieses Reagenz, das N-Succinimidyl-3-(2-pyridyldithio)-propionat (SPDP), ist aus 3-Mercaptopropionsäure, 2,2'-Dipyridyldisulfid und N-Hydroxysuccinimid leicht zugänglich:



Durch Reaktion des SPDP mit den SH-haltigen polymeren Trägern konnten auch polymere Thiolierungsreagenzien dargestellt werden. Dabei wird aus dem SPDP das 2-Thiopyridon frei. Dies kann dazu benutzt werden, durch Messung der optischen Absorption bei 343 nm das Ausmaß der Reaktion zu verfolgen:



Als Ausgangspolymere zur Darstellung der polymeren Thiolierungsreagenzien dienten die Träger 14 auf Basis von Poly(vinylalkohol) und Träger 16 aus Sepharose 4B. Träger 14 wurde mit SPDP zum polymeren Thiolierungsreagenz I und Träger 16 zum Reagenz II umgesetzt. Die Menge an 2-Thiopyridon, das bei dieser Verknüpfungsreaktion freigesetzt wurde, lag jeweils etwa zehn Prozent niedriger, als die zuvor mit DTNB ermittelte Menge an freien SH-Gruppen der Träger, es wurde also ein 90-prozentiger Umsatz der Thiolgruppen mit SPDP erreicht. In Tabelle 10 sind die Analysenwerte der Reagenzien I und II aufgeführt.

Tab. 10. Analysenwerte der Thiolierungsreagenzien I und II

Thiolierungs- reagenz	Ausgangs- polymer	freiges. 2-Thio- pyridon ($\text{mMol} \cdot \text{g}^{-1}$)	Elementaranalyse C	H	N	S
I	14	0,197	54,50	9,19	0,76	2,98
II	16	0,405	42,31	6,76	1,03	3,75

Bestimmung der freigesetzten Menge an 2-Thiopyridon:

Durch Messung der optischen Dichte bei 343 nm während der Reaktion der Träger mit SPDP.

3.1.4. Reaktive Träger auf der Basis von Carbonsäurederivaten

Unter den Reaktionen des N-Methylolmaleinimids (NMM) sind auch solche beschrieben, bei denen aus einem reaktiven Carbonsäurederivat mit NMM Ester gebildet werden⁴³. Eine solche Reaktion sollte es ermöglichen, NMM auch mit polymeren Carbonsäurederivaten zu verknüpfen. Als Carbonsäurederivate kamen Halogenide oder Anhydride in Frage. Problematisch war die Wahl der Reaktionsbedingungen: Protonen bewirken bei höheren Temperaturen die Abspaltung von Formaldehyd aus dem NMM und damit den Verlust der OH-Gruppe. Basen können den Imidring öffnen oder die anionische Polymerisation des NMM starten. So führt die Einwirkung von aliphatischen Aminen oder Anilin-Derivaten auf NMM zu mehr oder weniger stark gefärbten roten, violetten oder braunen, stark polaren Substanzen. Von einigen wasserabspaltenden Stoffen (zum Beispiel Dicyclohexylcarbodiimid) ist bekannt, daß sie die Umwandlung der Maleinimide in die Isomaleinimide katalysieren^{45,47}.

Wegen der zu erwartenden Probleme wurden mehrere Wege zur Synthese maleinimidhaltiger Polymere eingeschlagen: Es wurden polymere Säurechloride, polymere Carbonsäureanhydride und polymere gemischte Anhydride dargestellt und mit NMM umgesetzt. Dabei wurden die Reaktionstemperaturen, Reaktionszeiten, Art und Menge der verwendeten Hilfsbasen geändert. Ebenso wurde versucht, ob es möglich war, den Maleinimidring in einer Diehls-Alder-Reaktion zu schützen und dann am Polymeren eine Retro-Diehls-Alder-Reaktion durchzuführen. Die Versuche haben ergeben, daß nur eine Reaktion zum Erfolg führt: Die Veresterung von N-Methylolmaleinimid mit einem Carbonsäureanhydrid mit N-Methylmorpholin als Hilfsbase. Das Morpholinderivat erlaubte in verhältnismäßig langen Reaktionszeiten ungefärbte Polymere mit hohen gebundenen Maleinimidemengen zu erhalten.

3.1.4.1. Darstellung eines polymeren Säurechlorids und Veresterungsversuche mit N-Methylolmaleinimid

Weil an verschiedenen Copolymeren auf der Basis von Acrylsäurechlorid und Methacrylsäurechlorid unter diversen Reaktionsbedingungen keine Veresterung mit N-Methylolmaleinimid erfolgte, soll hier nur die Darstellung eines der verwendeten polymeren Säurechloride beschrieben werden.

Zur Polymerisation wurden als Monomere Methacrylsäurechlorid, Acrylsäuremethylester und 1,4-Divinylbenzol eingesetzt. Das Säurechlorid wurde kurz vor der Polymerisationsreaktion aus Benzoylchlorid und Methacrylsäure dargestellt und zweimal unter Feuchtigkeitsausschluß destilliert⁶⁶. 1,4-Divinylbenzol wurde aus dem käuflichen Isomerengemisch als Kupferkomplex abgetrennt und durch Destillation und Kristallisation gereinigt⁶⁷. Acrylsäuremethylester wurde unter Feuchtigkeitsausschluß destilliert und anschließend über Molekularsieb ($4 \text{ \AA}$) gelagert. 20 mmol des Säurechlorids, 20 mmol Methacrylat und 2 mmol 1,4-Divinylbenzol wurden dann zusammen mit $3,0 \text{ cm}^3$ absolutem Dioxan und etwa 20 mg Azobis(isobutyronitril) im Rohr bei 60°C radikalisch polymerisiert.

Hydrolyse einer Harzprobe mit 1 M Natronlauge und nachfolgende Titration der angesäuerten Lösung mit Silbernitrat ergab einen Chlorgehalt des Polymeren von 18,2 Gewichtsprozent gegenüber einem berechneten Wert von 17,4 Prozent. Die Polymerisations-

ausbeute betrug 93,2 Prozent.

Das Infrarotspektrum des erhaltenen Polymeren weist bei 3000 cm^{-1} und bei 2960 cm^{-1} die CH-Valenzschwingung auf, bei 1800 cm^{-1} die für Carbonsäurechloride charakteristische Bande und schließlich bei 1710 cm^{-1} die C=O -Valenzschwingung.

Es wurde nun versucht, dieses Harz mit N-Methylolmaleinimid zu verestern. N-Methylolmaleinimid wurde in Essigsäureethylester gelöst und nach Zugabe der Hilfsbase mit dem Polymeren umgesetzt. Die verwendeten Hilfsbasen dabei waren Pyridin, Triethylamin, 2,6-Dimethylpyridin, N,N-Dimethylanilin oder N,N-Dimethyl-4-aminopyridin. Bei allen Versuchen wurde analytisch nachgewiesen, daß keine Maleinimidgruppen an die Polymeren gebunden worden waren.

3.1.4.2. Copolymerisation gemischter Carbonsäureanhydride und deren Reaktion mit N-Methylolmaleinimid

Es wurden zwei gemischte Anhydride synthetisiert, polymerisiert und das Verhalten der Polymeren gegenüber N-Methylolmaleinimid untersucht. Die Anhydride wurden durch Einwirkung von Methacrylsäurechlorid auf Natriumacetat und Natriumtrifluoracetat in Diethylether erzeugt. Sie wurden nach dem Entfernen des Ethers destilliert. Die Polymerisation wurde mit Methylmethacrylat als Inertkomponente und Ethylenglycoldimethacrylat als Vernetzer in Dioxan mit Azobis(isobutyronitril) gestartet und das reaktive Harz nach drei Tagen bei 60°C mit trockenem Dichlormethan unter Feuchtigkeitsausschluß zwei Tage lang extrahiert. Die milchigtrüben Gele wurden dann, wie schon vorher beschrieben, gemahlen und ausgesiebt. Tabelle 11 listet die Reaktionsansätze auf und gibt die aus der Elementaranalyse erhaltenen Werte wieder. Diese Werte stimmen im Rahmen der erwarteten Genauigkeit mit den berechneten Werten überein. Die beiden Harze wiesen untereinander große Ähnlichkeit auf. Sowohl die mechanischen Eigenschaften als auch die Infrarotspektren waren fast identisch. Hier zeigten sich CH-Schwingungen bei 3000 cm^{-1} und die Banden für die Carbonylgruppen von Anhydrid und Ester bei 1800 cm^{-1} und 1720 cm^{-1} .

In den Lösungsmitteln Essigsäureethylester oder Dioxan lieferten diese Harze mit N-Methylolmaleinimid und einer Hilfsbase

Tab. 11. Copolymere aus gemischten Carbonsäureanhydriden

eingesetzte Carbonsäure	Anhydrid	Methylmethacrylat Vernetzer	Dioxan	C	H
Trifluor-essigsäure	2,50 (13,7)	1,37 (13,7)	0,54 (2,72)	ber ^a 48,51 gef 50,37	4,95 5,06
Essigsäure	4,08 (32,0)	3,19 (32,0)	0,25 (1,26)	ber ^a 57,98 gef 57,78	7,07 7,59

a: Die Gewichtsprozentage an C und H wurden aus dem Mengenverhältnis der eingesetzten Monomeren errechnet.

wie Pyridin, N-Methylmorpholin oder N,N-Dimethyl-4-aminopyridin zum größten Teil gefärbte Produkte, die einen geringen Stickstoffgehalt von etwa 0,5 Gewichtsprozenten hatten, aber nicht befähigt waren, mit Thiolgruppen zu reagieren.

3.1.4.3. Copolymere mit Maleinsäureanhydrid

Da es nicht möglich war, maleinimidhaltige Harze aus Copolymeren gemischter Carbonsäureanhydride zu erzeugen, wurde versucht, ein polymeres zyklisches Anhydrid mit N-Methylolmaleinimid umzusetzen. Neben dem Vorteil, daß hier keine Reaktionen zu niedermolekularen löslichen Estern möglich sind, ergibt sich nach der Reaktion der Anhydride mit dem N-Methylolmaleinimid ein Harz, welches freie Carboxylgruppen trägt. Da bei pH-Werten um den Neutralwert ein Teil dieser Gruppen ionisiert ist, trägt ein solches Harz negative elektrische Ladung und zieht Proteine mit hohen isoelektrischen pH-Werten über deren $-NH_3^+$ Gruppen elektrostatisch an⁵¹. Diese ionische Bindung des Proteins an das Harz sorgt für eine hohe Konzentration der Reaktionspartner an der Harzoberfläche und beschleunigt die nachfolgende kovalente Immobilisierungsreaktion.

Um ein wasserunlösliches, mechanisch stabiles und dennoch gut quellbares Polymer zu erhalten, wurden Maleinsäureanhydrid und Ethylvinylether mit 1,4-Butandioldivinylether als Vernetzer in Dioxan mit Benzoylperoxid als Starter radikalisch polymerisiert. Das molare Verhältnis der drei Monomeren betrug 1:1:0,1. Nach erfolgter Polymerisationsreaktion wurde das weiße körnige und spröde Harz mit Dichlormethan unter Feuchtigkeitsausschluß extrahiert und dann unter trockenem Petroleumbenzin zerkleinert und ebenfalls unter Petroleumbenzin ausgesiebt, so daß Korngrößen zwischen 0,10 mm und 0,20 mm zur Verfügung standen. Die Polymerisationsausbeute fiel auch bei kleinen Polymerisationsansätzen nicht unter 84 Prozent der theoretisch möglichen Harzmenge. Die Tabelle 12 enthält die charakteristischen Daten des Harzes. Die Anzahl der Carboxylgruppen wurde durch Versetzen einer genau abgewogenen Harzprobe mit einem Überschuß an 1 M Natronlauge und Rücktitration der unverbrauchten Lauge bestimmt. Nach der Hydrolyse war das vorher weiße, hydrophobe Harz zu einem stark gequollenen Gel geworden. Das trockene polymere Anhydrid besaß Hohlräume: Harzstücke saugten Isododekan auf. Die

Tab.12. Ergebnis der Analyse des Copolymeren aus Maleinsäureanhydrid

	Carboxylgruppen (mmol·g ⁻¹)	Elementaranalyse	
		C	H
Berechnet ^a :	10,85	57,32	6,23
Gefunden :	10,58	55,66	5,98

a: Die Gewichtsprozente an C und H sowie die Menge an Carboxylgruppen wurde aus dem Mengenverhältnis der eingesetzten Monomeren errechnet.

aufgenommene Isododekanmenge betrug dabei 0,892 Gramm je Gramm Harz. Wegen dieser Schwammstruktur und somit einer sehr großen Oberfläche konnte erwartet werden, daß das Harz in der Lage war, sehr große Eiweißmenge an seiner Oberfläche zu binden.

Das Infrarotspektrum zeigte die charakteristischen Banden für zyklische Carbonsäureanhydride bei 1780 cm⁻¹ und 1860 cm⁻¹, wobei, wie erwartet, die Bande bei 1780 cm⁻¹ die höhere Intensität hatte. Die Streckschwingung für die Gruppierung CO-C-CO erschien bei etwa 920 cm⁻¹. Schließlich fanden sich bei 1090 cm⁻¹ die Absorptionsbande der Ethergruppe und die Banden für die Methylengruppen bei 2920 cm⁻¹ und 2980 cm⁻¹.

3.1.4.4. Veresterung des polymeren Carbonsäureanhydrids

Die Veresterung des polymeren Maleinsäureanhydrids wurde in wasserfreiem Essigsäureethylester durchgeführt. Auch mit diesem Harz reagierte N-Methylolmaleinimid nicht im Beisein von Schwefelsäure oder 4-Toluolsulfonsäure. Hilfsbasen wie Pyridin, 2,6-Dimethylpyridin, N,N-Dimethylanilin, Triethylamin und N,N-Dimethyl-4-aminopyridin waren ebenfalls ungeeignet: Sie führten meist zu roten bis rotvioletten Zersetzungsprodukten des N-Methylolmaleinimids. Lediglich N-Methylmorpholin brachte sogar in sehr langer Reaktionszeit farblose Harze.

Alle Veresterungsversuche wurden in gleicher Weise ausgeführt, indem in einem verschlossenen Gefäß unter Feuchtigkeitsausschluß die Hydroxymethylverbindung in Essigsäureethylester gelöst oder suspendiert wurde. Zu dieser Mischung wurde eine ausreichende Menge trockenes N-Methylmorpholin

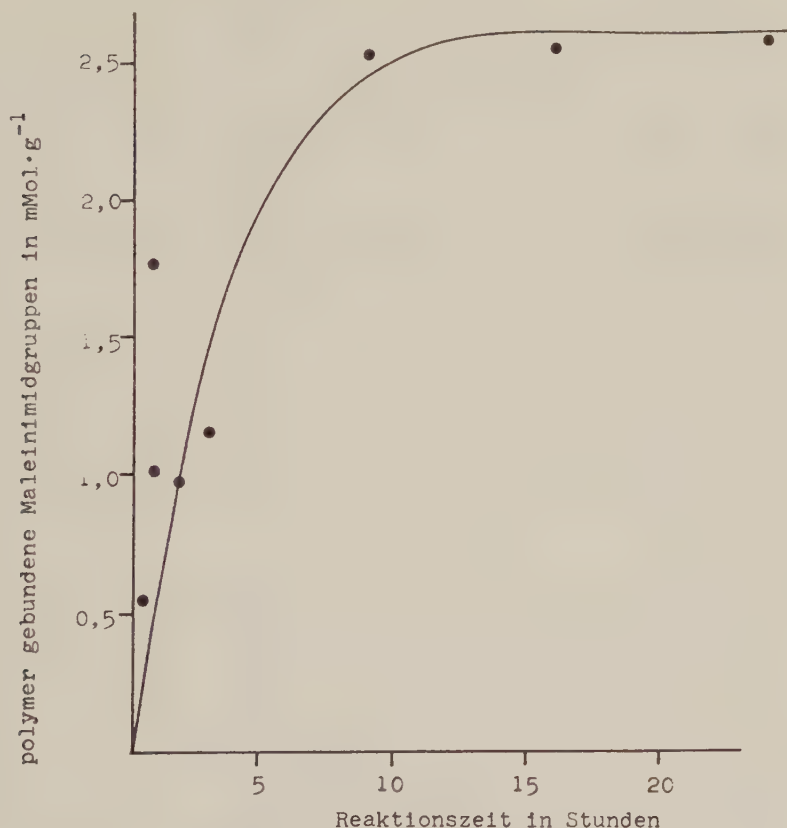
gegeben und dann das polymere Anhydrid. Nach angemessener Reaktionsdauer wurde das Harz dann auf einer Glasfritte abgesaugt und mit Aceton, Wasser und verdünnter Salzsäure gewaschen. Dann wurde wieder säurefrei gewaschen, das Wasser im Harz gegen Aceton ausgetauscht und mit Petroleumbenzin entquollen. Der polymere Ester wurde dann an der Luft getrocknet. Die Menge der ins Polymere eingeführten Maleinimidgruppen nach verschieden langer Reaktionsdauer ist in Abbildung 9 dargestellt. Sie wurde ermittelt, indem die Veresterungsreaktion des polymeren Anhydrids nach verschiedenen langen Reaktionszeiten unterbrochen wurde. Die dann am Polymeren gebundenen Maleinimidgruppen wurden mit Cystein umgesetzt und überschüssiges Cystein mit DTNB bestimmt.

In der Abbildung zeigt sich eine sehr schnelle Reaktion des N-Methylolmaleinimids mit dem polymeren Anhydrid während der ersten Stunde der Reaktion durch Bindung an der inneren und äußeren Oberfläche des polymeren Schwammes. Anschließend erfolgt die langsamere Aufnahme des N-Methylolmaleinimids in der Gelstruktur der Harzpartikel, die auch nach zwanzigstündiger Reaktion noch nicht beendet ist.

Die mit N-Methylolmaleinimid umgesetzten reaktiven Harze zeigten im Verlauf weiterer Untersuchungen, daß durch Hydrolyse die Maleinimidkomponente langsam wieder abgegeben wurde. Diese Hydrolyse konnte in Gegenwart von Proteinen nicht vermessen werden, da das N-Methylolmaleinimid im gleichen Spektralbereich absorbiert, wie die Proteine. Im Verlauf der Untersuchungen dieser Polymeren stellt sich dann heraus, daß sie im Stande waren, auch Proteine ohne Thiolgruppen zu immobilisieren.

Reaktive Träger konnten auch aus anderen Methylolverbindungen als aus N-Methylolmaleinimid synthetisiert werden. Um die Hydrolyse der reaktiven Träger und den Mechanismus der Immobilisierungsreaktion untersuchen zu können, wurden deshalb auch andere Hydroxymethylverbindungen mit dem polymeren Anhydrid verestert. Statt N-Methylolmaleinimid wurden N-Methylolsuccinimid, N-Hydroxymethyl-2-pyrrolidon, N-Hydroxymethylpropionsäureamid, N-Hydroxymethyl-4-nitrobenzoesäureamid und N-Hydroxymethyl-3,6-endo-oxa-⁴-tetrahydrophthalimid eingesetzt. Das Phthalimiderivat zeigte

Abb.9. Menge der durch polymeres Maleinsäureanhydrid gebundenen Maleinimidgruppen als Funktion der Reaktionszeit



Bestimmung der polymer gebundenen Maleinimidgruppen:

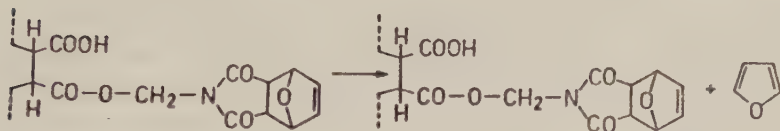
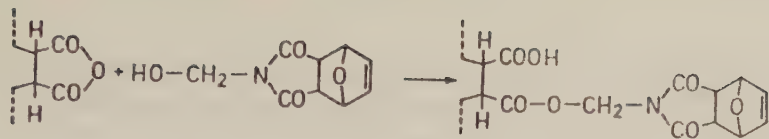
Je etwa 50 mg Harz wurden 5,00 cm³ Cysteinlösung vom pH 6,0 (eingestellt mit Titrisol-Puffer) bei Raumtemperatur suspendiert. Die Menge des nicht vom Harz gebundenen Cystein wurde mit DTNB bestimmt.

während der Veresterungsreaktion keine Nebenreaktionen mit den verwendeten Hilfsbasen. Nach der Veresterung mit dem Polymeren kann in einer Retro-Diels-Alder-Reaktion aus dem Tetrahydrophthalimid das Maleinimid durch Abspalten von Furan gewonnen werden:

Tab. 13. Analytische Daten der Ester aus polymerem Maleinsäureanhydrid und N-Hydroxymethylverbindungen

Träger N-Hydroxymethylderivat		Stickstoffgehalt Menge an eingef. Methylol- Gewichts Zunahme	
		(Gewichtsproz.)	komponente ($\text{mmol} \cdot \text{g}^{-1}$) ^a
		(mg · g ⁻¹)	
18a	N-Methylolmaleinimid	3,56	2,54
18b		2,91	2,08
19	N-Methylolsuccinimid	2,53	1,81
20	-----	0,00	0,00
21	N-Methylolpyrrolidon-2	3,71	2,65
22	N-Methylolpropionamid	3,20	2,28
23	N-Methylol-4-nitro- benzoesäureamid	2,30	1,64
24	N-Methylol-3,6-endo-oxa- 4'-tetrahydrophthalimid	2,69	1,92
			220

a: Der Gehalt an eingeführter N-Methylolkomponente wurde aus dem Stickstoffgehalt der Polymeren berechnet.



3.1.4.5. Charakterisierung der polymeren Carbonsäure-N-Methylol-Ester

Die polymeren Carbonsäureester entstanden in zwanzigstündiger Reaktion aus der jeweiligen N-Hydroxymethylverbindung und dem polymeren Anhydrid. Sie stellen die Träger 18 bis 24 dar. Bei der Darstellung des Trägers 20 wurde keine Hydroxymethylkomponente eingesetzt, sonst aber genau wie bei den anderen Veresterungsreaktionen verfahren. In der Tabelle 13 sind die analytischen Daten der Träger aus polymerem Maleinsäureanhydrid zusammengestellt.

Die Maleinimidgruppen an den Trägern 18a und 18b wurden, wie bei allen bisher beschriebenen maleinimidgruppenhaltigen Trägern, ebenfalls mit Cystein umgesetzt und überschüssiges Cystein mit DTNB optisch quantitativ bestimmt. Dabei ergab sich für die beiden Harze ein Gehalt von 2,50 mmol Maleinimidgruppen des Trägers 18a und von 2,04 mmol am Träger 18b. Innerhalb der Genauigkeit der Messungen stimmten diese Zahlen mit den aus dem Stickstoffgehalt berechneten Werten überein. Beim Träger 18a haben 48 Prozent der Anhydridgruppen mit dem N-Methylol-maleinimid reagiert. Die Gewichtszunahme der Harze nach der Veresterungsreaktion war größer, als sie durch die neu ins Polymere eingeführten Maleinimidgruppen sein sollte. Dies ist sicher auf die Verseifung der restlichen Anhydridgruppen oder auf Adsorption von Wasser oder Lösungsmittel ans Harz zurückzuführen.

Die Infrarotspektren der Träger enthielten neben den schon im Spektrum des polymeren Anhydrids sichtbaren Banden die der neu eingeführten Carbonylgruppen bei 1720 cm^{-1} und bei 3510 cm^{-1} . Das Spektrum des Trägers 18 wies die beiden für den Maleinimidring typischen Banden bei 700 cm^{-1} und bei 830 cm^{-1} auf. Die

Nitrogruppen des Trägers 23 waren bei 1350 cm^{-1} zu erkennen.

Das Verhalten der Harze hing in hohem Maß vom pH-Wert der umgebenden Lösung ab. Während die Polymeren im Säuren bis Neutralen recht stabil waren, zerfielen sie in alkalischem Medium sehr rasch in die Hydroxymethylverbindung und die polymere Carbonsäure. Wahrscheinlich ist für die Geschwindigkeit der Hydrolyse und für Reaktionen des Esters mit Aminogruppen das der Estergruppe benachbarte Carboxylat verantwortlich. Dieses Verhalten ist auch von niedermolekularen Estern der Dicarbonsäuren bekannt. Wenn man die Hydrolysegeschwindigkeit eines Glutarsäureesters willkürlich gleich eins setzt, ist in der Reihe 2,2-Dimethylmalonsäureester, Bernsteinsäureester und 3,6-Endo-oxa- Δ^4 -tetrahydrophthalsäureester eine Steigerung der Hydrolysegeschwindigkeit bis zum 53000-fachen beobachtet worden⁶⁸, allein dadurch, daß die Beweglichkeit der nicht veresterten Carboxylgruppe dieser Carbonsäuren zur Estergruppierung durch Substitution eingeschränkt worden ist. Auch in den hier verwendeten Harzen ist durch die Polymerisationsreaktion diese Beweglichkeit der Carboxylgruppen zueinander behindert, so daß ein Nachbargruppeneffekt die Alkaliempfindlichkeit der Polymeren und ihre Reaktivität Proteinen gegenüber erklären kann.

Um einen ungefähren Eindruck dieser Hydrolysegeschwindigkeit auch unter den Reaktionsbedingungen zu erhalten, wie sie bei einer Immobilisierungsreaktion herrschen, wurde eine niedermolekulare Modellschubstanz für die reaktiven Träger aus N-Methylolsuccinimid und Bernsteinsäureanhydrid dargestellt. Der pK_s der freien COOH-Gruppe nach der Veresterung betrug 4,63. Die Esterhydrolyse wurde bei 25°C pH-statisch mit 1 M Natronlauge gemessen. Bei pH 7,0 wurde eine Hydrolysegeschwindigkeit von $0,521\text{ }\mu\text{Mol}\cdot\text{min}^{-1}$, bei pH 8,0 eine von $2,488\text{ }\mu\text{Mol}\cdot\text{min}^{-1}$ und bei pH 9,0 von $20,250\text{ }\mu\text{Mol}\cdot\text{min}^{-1}$ gemessen. Am Polymeren wurde die Hydrolyse der Estergruppierung photometrisch an Hand der Menge der vom Harz abgegebenen N-Hydroxymethylverbindung bestimmt. Unter den Bedingungen, wie sie in einer Immobilisierungsreaktion herrschen, setzte Träger 18 bei 25°C und pH 6,0 $120\text{ }\mu\text{Mol}$ des N-Methylolmaleinimids frei, also $0,5\text{ }\mu\text{Mol}\cdot\text{min}^{-1}$.

Die Hydrolyse der polymeren Ester zeigte sich auch bei der Messung ihrer Schüttvolumina: Die Quellung der Träger war in

hohem Maße zeitabhängig. Bei pH 9,0 brauchten die Harze in Tris-Isol-Puffer bis zu fünf Stunden, bis keine weitere Vergrößerung der Schüttvolumina mehr registriert werden konnte. In dieser Zeit hatten sich die Schüttvolumina der Träger versechsfacht, von anfänglich etwa $2,08 \text{ cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$ waren sie auf etwa $12 \text{ cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$ angewachsen. Wegen des mit steigenden pH-Werten erhöhten Ionisierungsgrades der COOH-Gruppen der Polymeren war die Quellung in wässrigen Lösungen auch vom pH-Wert abhängig. Bei pH 6,0 wurden Schüttvolumina von $8,2 \text{ cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$, bei pH 8,0 von etwa $11,5 \text{ cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$ und bei pH 10,0 von $12,5 \text{ cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$ gemessen. Oberhalb von pH 10,0 wurde keine wesentliche Zunahme des Harzvolumens mehr beobachtet. Nach beendeter Volumenzunahme waren an den Harzen hier auch keine Estergruppen mehr nachweisbar.

Die reaktiven Träger 18 und 19 sowie 21 bis 24 sind entstanden, indem etwa die Hälfte der Anhydridgruppen des Ausgangspolymeren mit den Methylolverbindungen verestert worden ist. Die Hydrolyse weiterer Anhydridgruppen erfolgte beim Extrahieren und Waschen der reaktiven Harze nach der Veresterungsreaktion. Da alle so dargestellten reaktiven Träger in der Lage waren, schnell große Proteinmengen zu immobilisieren, wurde durch verlängerte Reaktionszeiten mit dem Ester oder tagelanges Aufbewahren der Träger unter Puffer sichergestellt, daß alle Anhydridgruppen wirklich abreagiert waren, also für die Reaktion mit Proteinen nicht verantwortlich waren.

3.2. Eigenschaften und chemische Modifizierung der verwendeten Enzyme

Zur Immobilisierung von Proteinen an Polymere mit Maleinimidgruppen werden SH-haltige Enzyme benötigt. Da auch die Möglichkeit besteht, daß die Aminogruppen oder Imidazolreste der Proteine mit den Maleinimidgruppen reagieren, oder daß die Proteine ionisch oder über noch am Harz vorhandene andere reaktive Gruppen (Aldehyde, Carbonsäurederivate) gebunden werden, muß sichergestellt werden, daß Enzyme ohne SH-Gruppen mit den in Frage kommenden Harzen nicht reagieren. Zur Untersuchung der Immobilisierungsreaktionen werden also einerseits Proteine mit SH-Gruppen und andererseits solche ohne Thiolgruppen benötigt. Die zu immobilisierenden Proteine sollten gut charakterisiert sein. Sie sollten außerdem von hohem Reinheitsgrad sein.

Aus den oben angeführten Gründen wurden in dieser Arbeit die in Tabelle 14 aufgeführten Proteine verwendet. Die ersten vier Enzyme der Tabelle sind Hydrolasen ohne freie SH-Gruppen, die restlichen drei haben verschieden hohe Mengen freier Thiolgruppen. Die Thiolgruppe des Papains spielt bei der Spaltung des Enzymsubstrates eine Rolle und ist für die Aktivität des Enzyms unentbehrlich⁶⁹. Urease und Katalase sind metallhaltige Enzyme (Nickel und Eisen) mit mehreren Thiolgruppen. Bei der Urease variiert die in der Literatur angegebene Zahl der Thiolgruppen zwischen 47¹¹ und 88⁷⁰; für eine der sechs Untereinheiten der Urease wurden per Hydrolyse elf Cysteingruppen ermittelt⁷¹, die im Enzym unterschiedlich hohe Reaktivität aufweisen und nicht alle für die enzymatische Aktivität vonnöten sind. Bezogen auf das gesamte Molekül mit einem Molekulargewicht von etwa 483000 g·Mol⁻¹ sind von 82 Thiolgruppen 27 reaktiv gegen Reagenzien wie Maleinimid und acht inaktiv⁷². Die 27 SH-Gruppen können ohne Auswirkungen auf die Enzymaktivität blockiert werden, weitere 35 Thiolgruppen haben nach Reaktion mit Maleinimiden oder Schwermetallionen den Verlust der Aktivität zur Folge⁷⁶. Katalase besteht aus vier Untereinheiten, die als prosthetische Gruppe je ein Häm-Molekül nicht-kovalent gebunden haben. Eine Untereinheit enthält vier Cysteinmoleküle und weist ein Molekulargewicht von 57500 auf^{73,74}. Katalase verliert ihre Aktivität beim Einfrieren oder Auftauen⁷⁵. In der Katalase scheinen keine Disulfidbrücken vorzuliegen, also entspricht die Anzahl der Cysteinmoleküle direkt der Menge an freien Thiolgruppen.

Tab. 14. Zu Immobilisierungsreaktionen verwendete Enzyme

Name	: α -Chymotrypsin	Trypsin	Ribonuclease	Lysozym	Papain	Urease	Katalase
E.C.-Nummer	: 3.4.21.1.	3.4.21.4.	3.1.4.22.	3.2.1.17.	3.4.22.2.	3.5.1.5.	1.11.1.6.
<u>Basische Aminosäuren</u>							
Lysin	: 14	14	10	6	9	234	108
Histidin	: 2	3	4	1	2	120	84
Arginin	: 3	2	4	11	11	186	124
<u>Schwefelhaltige Aminosäuren</u>							
Cystein	: 10	12	8	8	7	> 66	16
Methionin	: 2	2	4	2	-	114	40
Anzahl freier Thiolgruppen	: -	-	-	-	1	> 66	8
Anzahl an Untereinheiten	: -	-	-	-	-	6	4
Metallgehalt	: -	-	-	-	-	Ni	Fe
Molgewicht	: 25234	23281	14700	14600	23000	483000	232400
isoionischer pH-Wert	: 8,0	10,1	7,8	11,1	8,8	5,1	5,4
pH-Wert der maximalen Aktivität:	8,5	> 8,5	7,1	6,2	6,5	6,0	7,0
Substrat	: ATEE	BAEE	Cytidinmonophosphat	M. lysodeikticus	BAEE	Harnstoff	Wasserstoffperoxid

3.2.1. Bestimmung der Enzymaktivitäten

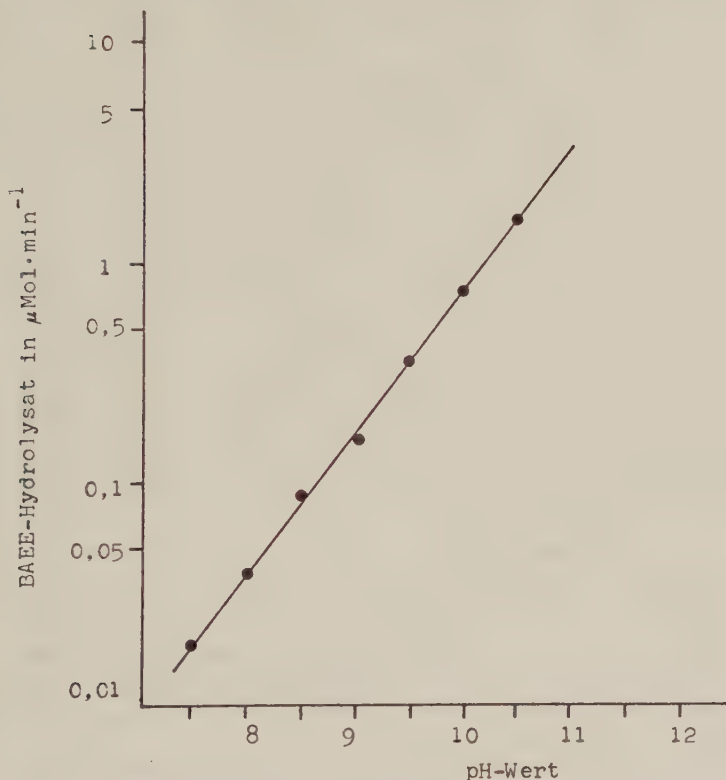
Wegen der Verschiedenartigkeit der verwendeten Enzyme mußten auch verschiedene Methoden der Messung ihrer Aktivität angewendet werden. Die Aktivitäten von Trypsin, α -Chymotrypsin, Papain und Ribonuclease wurden pH-statisch mit 0,1 M Natronlauge bei 25°C bestimmt. Die Aktivität der Urease wurde durch Titration des freigesetzten Ammoniaks mit 0,1 M Salzsäure pH-statisch gemessen, die der Katalase UV-absorptiostatisch und die Aktivität des Lysozyms photometrisch. Dabei wurden für Trypsin und Papain N ^{α} -Benzoyl-L-argininethylesterhydrochlorid (BAEE) als Substrat verwendet, für α -Chymotrypsin N-Acetyl-L-tyrosinethylesterhydrat (ATEE), für Urease Harnstoff, für Ribonuclease Cytidin-2,3-cyclophosphat Bariumsalz, für Katalase Wasserstoffperoxid und für Lysozym eine Suspension von Micrococcus Lysodeicticus. Bei der pH-statischen Messung der Enzymaktivitäten wurde eine Anordnung aus Bürette, thermostatisiertem Reaktionsgefäß und Steuergerät verwendet. Die je Zeiteinheit verbrauchte Säure oder Lauge, die benötigt wurde, um den pH-Wert im Reaktionsgefäß konstant zu halten, wurde ausgedruckt. Der Mittelwert der linearen Anfangsgeschwindigkeit des Substratverbrauchs wurde zur Berechnung der Enzymaktivität herangezogen. Sie wird hier in $\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$ angegeben (mit Ausnahme des Lysozyms gilt $1 \text{ U} = 1 \mu\text{Mol} \cdot \text{min}^{-1}$).

3.2.1.1. Aktivität des Trypsins

Für die Messung der Aktivität des Trypsins wurden 20 cm³ einer 0,0105 M BAEE-Lösung und 1,00 cm³ einer 0,21 M Lösung von Tris-(hydroxymethylaminomethan) (TRIS), die 2,10 M an Natriumchlorid war, gemischt, so daß die resultierende Lösung 0,0100 M an BAEE, 0,010 M an TRIS und 0,100 an NaCl war. Wegen der Eigenhydrolyse des BAEE, die besonders bei hohen pH-Werten nicht mehr zu vernachlässigen ist, wurde bei 25°C für eine Anzahl von pH-Werten diese Eigenhydrolyse bestimmt und halblogarithmisch gegen den pH-Wert aufgetragen. Aus der erhaltenen Geraden konnte so für jeden pH-Wert die Hydrolysegeschwindigkeit des BAEE abgelesen werden und von der gemessenen Aktivität abgezogen werden. Abbildung 10 zeigt diese Gerade.

Die Aktivität des in dieser Arbeit verwendeten Trypsins läßt

Abb.10. Eigenhydrolyse von BAEE bei 25°C bei verschiedenen pH-Werten



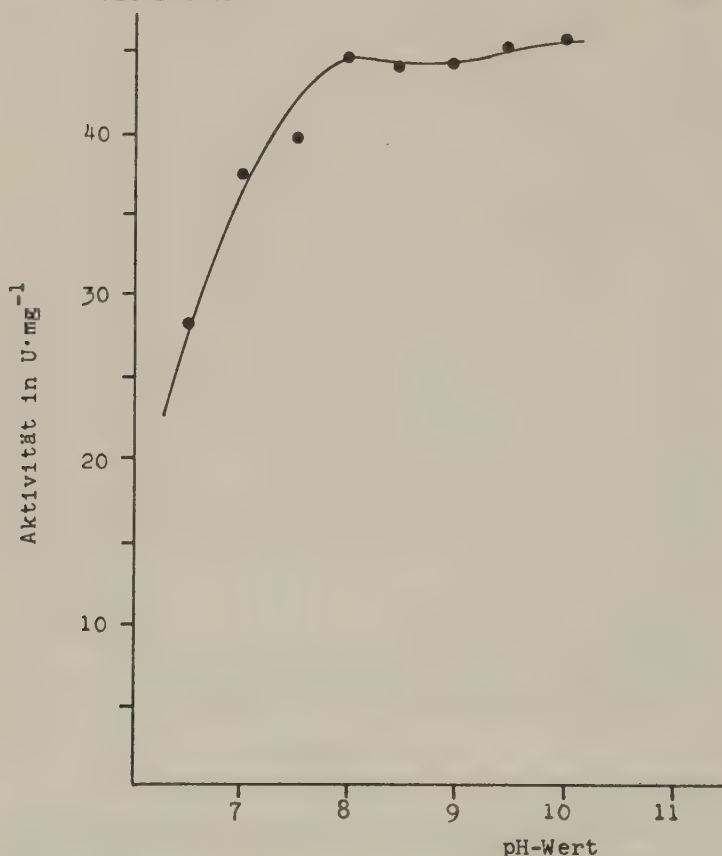
Reaktionsbedingungen:

21,0 cm³ Lösung (0,0100 M an BAEE, 0,010 M an TRIS·HCl, 0,100 M an NaCl) wurde bei 25°C mit 0,1 M NaOH pH-statistisch titriert.

sich aus Abbildung 11 ablesen. Bei pH 8,0 wird ein Wert von 44,3 U·mg⁻¹ erreicht. Bei höheren pH-Werten bleibt dieser Wert etwa erhalten. Die zur Messung eingesetzte Trypsinmenge betrug hier etwa jeweils 0,3 mg. Der pH-Wert wurde durch Zugabe eines entsprechenden TRIS-Puffers zur Reaktionslösung voreingestellt. Die Trypsinlösungen wurden vor den Aktivitätsmessungen frisch angesetzt, um Verfälschungen durch eine Eigenverdauung des Enzyms zu vermeiden.

Zum Vergleich mit einigen der später beschriebenen Immobilisate wurde ebenfalls der K_M -Wert des löslichen Trypsins mit dem

Abb.11. pH-Profil der Aktivität von nativem Trypsin mit BAEE als Substrat



Aktivitätsmessung:

pH-statisch mit 0,1 M Natronlauge bei 25°C in 21,0 cm³
 0,010 M BAEE, 0,010 M TRIS·HCl, 0,100 M NaCl mit je et-
 wa 0,3 mg Trypsin

zuvor beschriebenen pH-Staten bestimmt, indem die BAEE-Konzentration variiert wurde. Die erhaltenen Aktivitätswerte und die zugehörigen Substratkonzentrationen wurden doppelt reziprok nach Lineweaver-Burke aufgetragen und aus dem Abszissenschnittpunkt der erhaltenen Geraden der K_M -Wert zu $4,94 \cdot 10^{-5}$ Mol·dm⁻³ bestimmt. Der Ordinatenschnittpunkt ergab die maximale Aktivität des Enzyms $V_{max} = 45,5$ U·mg⁻¹.

3.2.1.2. Aktivität des α -Chymotrypsins

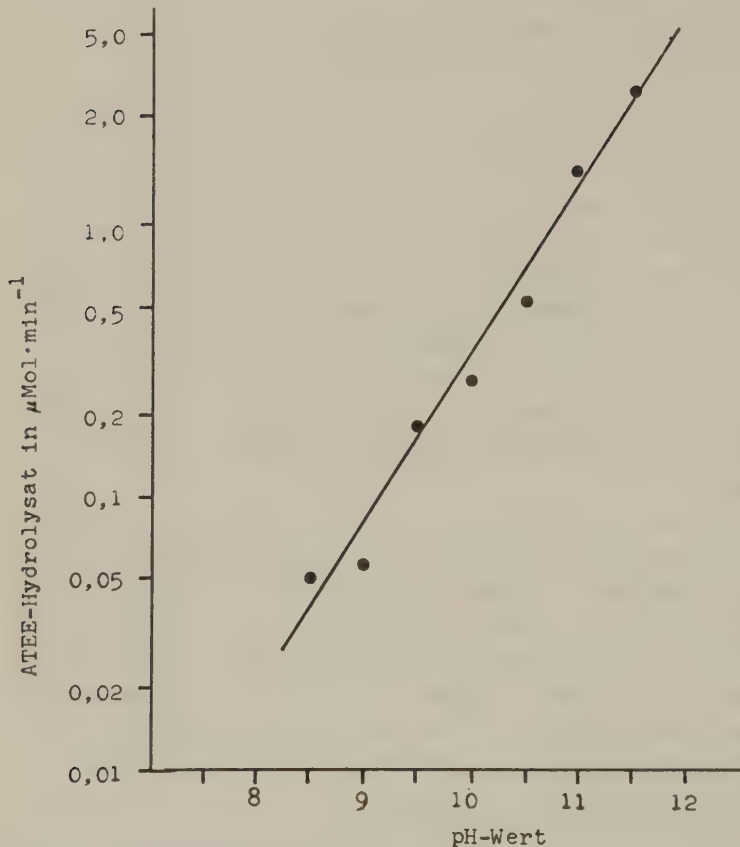
Als Substrat für α -Chymotrypsin wurde N-Acetyl-L-tyrosinethylester (ATEE) gewählt. Zum Einsatz kamen jeweils 10,0 cm³ einer 0,022 M Lösung des Substrats, die fünfprozentig an Ethanol war, um das Substrat in Lösung zu bringen. Diese wurden mit 1,00 cm³ einer Lösung gemischt, die 0,220 M an TRIS-HCl und 2,20 M an NaCl war, so daß die Lösung bei der Aktivitätsmessung 0,020 M an ATEE, 0,020 M an TRIS-HCl und 0,200 M an NaCl war. Ebenso wie beim BAEE wurde auch für ATEE die Eigenhydrolyse bei verschiedenen pH-Werten gemessen, um sie später bei Aktivitätsmessungen berücksichtigen zu können. Abbildung 12 gibt die bei halblogarithmischer Auftragung entstehende Gerade wieder. Es ist zu sehen, daß die Hydrolysegeschwindigkeit des ATEE bei gleicher Temperatur und gleichem pH-Wert nur etwa ein Drittel der Hydrolysegeschwindigkeit des BAEE ist. Die Hydrolyse des ATEE kommt bei Messungen der Enzymaktivität erst bei höheren pH-Werten zur Geltung.

In Abbildung 13 ist der Verlauf der katalytischen Aktivität von α -Chymotrypsin im pH-Bereich von 7 bis 10 dargestellt. Das Enzym erreicht seine höchste Aktivität bei pH 8,5. Oberhalb und unterhalb dieses Wertes sinkt die Aktivität des Enzyms stark ab. Bei pH 8,5 wurde auch der K_M -Wert des α -Chymotrypsins durch Messung der Aktivität bei verschiedenen Substratkonzentrationen zu $K_M = 2,83 \cdot 10^{-3} \text{ Mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ und die maximale Geschwindigkeit der Substratspaltung zu $V_{\max} = 395 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ bestimmt.

3.2.1.3. Aktivität der Ribonuclease

Die Aktivität von Ribonuclease wurde ebenfalls pH-statisch durch Spaltung des Bariumsalzes von Cytidin-2',3'-cyclophosphat verfolgt. Dabei wurden zur Messung 1,50 cm³ der 22,2 mM Substratlösung, die 0,10 M an NaCl war, eingesetzt. Die Titration der durch das Enzym freigesetzten Phosphorsäure erfolgte bei 25°C mit 0,05 M Natronlauge bei pH 7,1. Die Enzymmenge bei dieser Messung betrug 104,1 μg . Es wurde eine enzymatische Aktivität von 18,73 $\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$ ermittelt.

Abb. 12. Eigenhydrolyse von ATEE bei 25°C bei verschiedenen pH-Werten



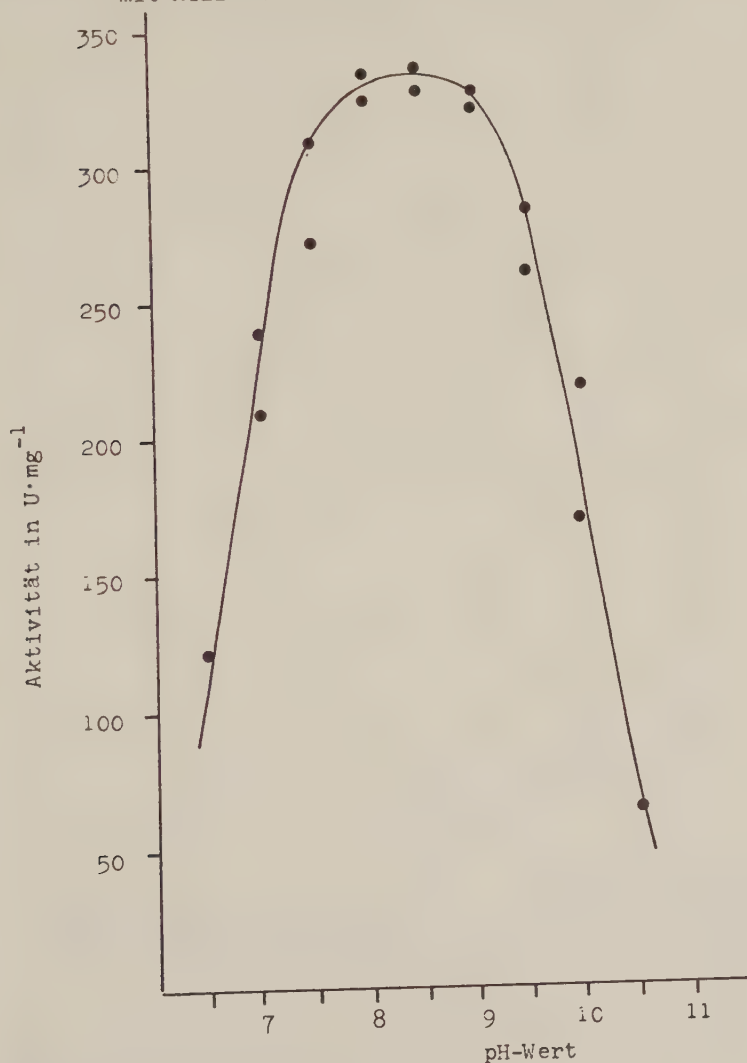
Reaktionsbedingungen:

11,0 cm³ Lösung (0,020 M an ATEE, 0,020 M an TRIS·HCl, 0,200 M an NaCl und 4,55 prozentig an Ethanol) wurde bei 25°C pH-statisch mit 0,1 M Natronlauge titriert.

3.2.1.4. Aktivität von Urease

Urease wurde durch ihre Fähigkeit, Harnstoff zu hydrolysieren, bestimmt, indem das dabei gebildete Ammoniumhydroxid mit 0,1 M Salzsäure pH-statisch zurücktitriert wurde. Bei der Berechnung der Aktivität wurde berücksichtigt, daß bei der Spaltung eines Substratmoleküls zwei Moleküle Ammoniak gebildet werden. Zur Messung wurden 20,0 cm³ 0,17 M Harnstofflösung eingesetzt und

Abb.13. pH-Profil der Aktivität von nativem α -Chymotrypsin
mit ATEE als Substrat

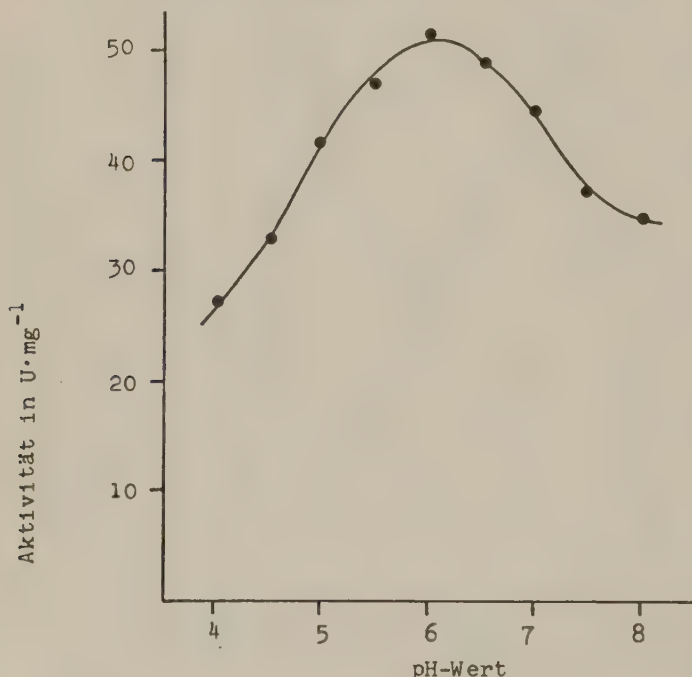


Messung der Aktivität:

pH-statisch mit 0,1 M Natronlauge bei 25°C in 11,0 cm³
0,020 M ATEE, 0,020 M TRIS·HCl, 0,200 M NaCl mit je et-
wa 70 µg α -Chymotrypsin.

1,00 cm³ 0,220 M TRIS·HCl-Puffer, der 2,20 M an NaCl war. Die Temperatur wurde auf 25°C gehalten. Das erhaltene Aktivitätsprofil gibt Abbildung 14 wieder. Die Aktivität der Urease war bei pH 6,2 maximal.

Abb.14. pH-Profil der Aktivität von Urease bei 25°C mit Harnstoff als Substrat



Messung der Aktivität:

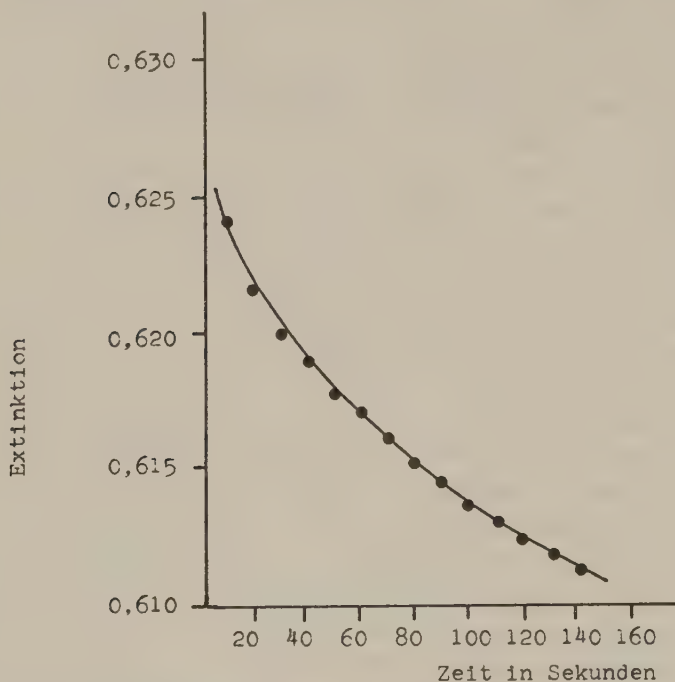
pH-statisch mit 0,1 M Salzsäure bei 25°C in 20,0 cm³ Harnstoff lösung (0,17 M) und 1,00 cm³ 0,220 M TRIS·HCl mit 2,20 M NaCl mit je etwa 0,5 mg Urease

3.2.1.5. Aktivität von Katalase

Katalase spaltet Wasserstoffperoxid in Wasser und Sauerstoff. Der zeitliche Verlauf dieser Reaktion läßt sich verfolgen, indem man entweder die Abnahme der Peroxidmenge mißt oder die Menge des entstandenen Sauerstoffs bestimmt. Da Licht mit einer Wellenlänge von 240 nm durch Wasserstoffperoxid absorbiert wird

($43600 \text{ cm}^2 \cdot \text{Mol}^{-1}$), ist die Abnahme der Peroxidmenge leicht zu messen, indem man Katalase und Wasserstoffperoxid in einer Küvette mit einem geeigneten Puffer mischt und die Abnahme der Absorption bei 240 nm verfolgt. Die Anwendbarkeit dieser Methode ist aber zum einen dadurch begrenzt, daß die bei der Reaktion in der Küvette entstehenden Gasblasen die Messung stören oder sogar ganz unmöglich machen. Zum anderen läßt sich mit immobilisierter Katalase die Messung der Enzymaktivität so ohnehin nicht durchführen, da im Strahlengang des Photometers Harzpartikel wären. Außerdem erfolgt durch die starke Sauerstoffentwicklung an den Harzteilen die Trennung von Substratlösung und Harz, weil das Harz aufschwimmt. Deshalb wurde die enzymatische Spaltung des Substrats außerhalb der Küvette in einem thermostatisierten Gefäß durchgeführt und die Substratlösung mit einer leistungsfähigen Pumpe über eine Fritte aus der Reaktionslösung in die Küvette und wieder zurück gepumpt. Durch die hohe Flußgeschwindigkeit in der Küvette war es Gasblasen nicht möglich, sich dort festzusetzen, so daß ein Gasabscheider nicht nötig war. Wurde die Absorption der Peroxidlösung gegen die Reaktionszeit aufgetragen, so entstand eine Kurve, wie sie in Abbildung 15 zu sehen ist. Die Aktivität der Katalase wurde aus der Anfangssteigung der Kurve ermittelt. Diese Aktivitäten waren aber in hohem Maß von der verwendeten Peroxidkonzentration abhängig. Außerdem zeigte sich beim Vermessen der Aktivitäten von immobilisierter Katalase, daß höhere Peroxidkonzentrationen das polymer gebundene Enzym irreversibel zerstören. Dieses Verhalten ist für ein Immobilisat aus Träger 1 in Abbildung 16 dargestellt. Es ist deutlich zu erkennen, daß die Steilheit der Kurve bei der zweiten Messung (●) abgenommen hat. Jede weitere Messung führte zu weiterem Aktivitätsverlust. Die hier verwendete Peroxidkonzentration war etwa $0,172 \text{ Mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Es ist ebenfalls möglich, daß auch die Krümmung der erhaltenen Aktivitätskurven (Abbildung 15) teilweise auf eine Denaturierung der Katalase durch hohe Peroxidkonzentrationen zurückzuführen ist⁷³. Vernünftige Ergebnisse bei der Messung der Katalaseaktivität können als nur erwartet werden, wenn bei konstanten, kleinen Substratkonzentrationen gemessen

Abb.15. Zeitlicher Verlauf der Spaltung von Wasserstoffperoxid durch Katalase



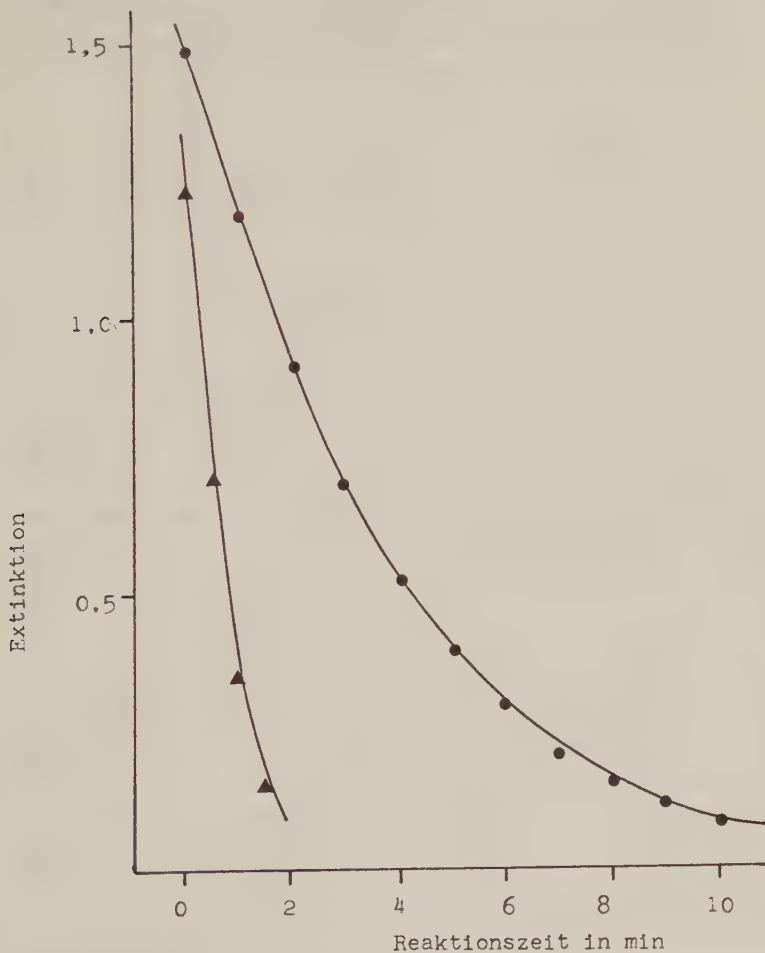
Reaktionsbedingungen:

Messung der optischen Dichte bei 25°C und 240 nm in einer Durchflußküvette. Schichtdicke 0,100 cm. Substratlösung: 20,0 cm³ 0,10 M Wasserstoffperoxid und 1,00 cm³ 50 mM Phosphat-Puffer pH 7,0. Eingesetzte Katalasemenge: 1 µg.

wird. Um die Substratkonzentration konstant zu halten, muß die bei der Spaltung durch das Enzym verbrauchte Menge dauernd ersetzt werden. Die Zugabe von Substrat je Zeiteinheit entspricht der Aktivität des untersuchten Enzyms. Durch solche "absorptiostatische" Aktivitätsmessung konnte für die Katalase ein zeitlich linearer Substratverbrauch und damit eine über längere Zeit konstante Enzymaktivität erreicht werden⁷⁴.

Die beschriebene Apparatur zur absorptiostatischen Messung der Katalaseaktivität wurde hier nach einigen Verbesserungen für die Bestimmung der Aktivität immobilisierter Katalase eingesetzt.

Abb.16. Aktivitätsverlust von immobilisierter Katalase



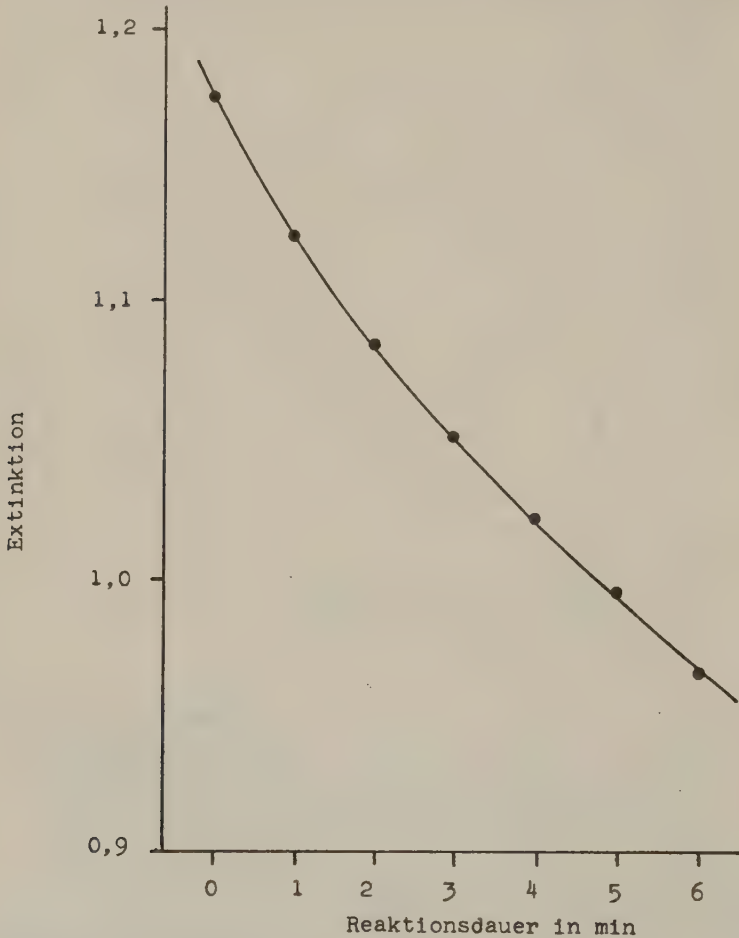
Reaktionsbedingungen:

3,65 mg Immobilisat mit 126,5 mg Katalase je Gramm Träger wurden in 20,0 cm³ Wasserstoffperoxidlösung und 1,00 cm³ 50 mM Phosphatpuffer pH 7.0 bei 25° suspendiert. Die optische Dichte der Lösung wurde bei 240 nm gemessen. Schichtdicke der Küvette 0,200 cm.

3.2.1.6. Aktivität von Lysozym

Als Substrat für Lysozym wurde eine Suspension von *Micrococcus Lysodeicticus* in 0,066 M Phosphatpuffer pH 6,24 verwendet. Aktivitätsbestimmend ist die Fähigkeit des Enzyms, die Zellwände des *M. Lysodeicticus* durch Hydrolyse von β -1,4-Bindungen zwi-

Abb.17. Änderung der Extinktion einer Suspension von *Micrococcus Lysodeicticus* durch immobilisiertes Lysozym



Reaktionsbedingungen:

58,41 mg *M. Lysodeicticus* in 50,0 cm³ 0,066 M Phosphatpuffer pH 6,25 wurden bei 25°C mit 21,22 mg Immobilisat gemischt. Die Suspension wurde durch eine Küvette ($d = 0,200$ cm) gepumpt und die Extinktion bei 450 nm registriert. Immobilisat: 30,1 mg·g⁻¹ Lysozym an Träger 3.

schen Muraminsäure und Desoxy-D-glucose zu zerstören. Die zunächst trübe Zellsuspension klärt sich deshalb im Lauf der Zeit durch die Wirkung des Enzyms. Die in der Zellsuspension

vorhandene Menge an M.Lysodeicticus wird bei 450 nm optisch verfolgt. Aus der Abnahme der Extinktion berechnet sich die Enzymaktivität nach folgender Formel:

$$\text{Aktivität} = 1000 \cdot \Delta E_{450} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1} \text{ Protein (U} \cdot \text{mg}^{-1})$$

Die Reaktionsbedingungen zur Messung der Aktivität, unter denen das hier verwendete Lysozym eine Aktivität von $44000 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ aufweist, konnten hier aber nicht angewendet werden, da nicht nur die Aktivität von löslichem Lysozym sondern auch von immobilisiertem Enzym gemessen werden mußte. Bei der in dieser Arbeit verwendeten Methode der Aktivitätsmessung von Lysozym zeigte das Enzym eine Aktivität von $56600 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$. Daher wurde bei allen Messungen der Aktivität von löslichem und immobilisiertem Lysozym die Aktivität nicht nach $\Delta E = 1000 \text{ U}$ bestimmt, sondern nach $\Delta E = 1286 \text{ U}$. Die in Abbildung 17 als Beispiel für die Messung der Aktivität eines Immobilisats dargestellte Kurve ergab so für das Immobilisat eine Aktivität von 4594 U je Gramm .

3.2.2. Thiolierungsreaktionen

In die meisten Proteine ohne eingene freie SH-Gruppen lassen sich über Thiolierungsreaktionen solche Gruppen einführen. In dieser Arbeit wurde versucht, α -Chymotrypsin, Trypsin, Ribonuclease A und Lysozym zu thiolieren. Diese Enzyme sind dann über ihre neuen SH-Gruppen ebenfalls an maleinimidhaltigen Harzen immobilisierbar.

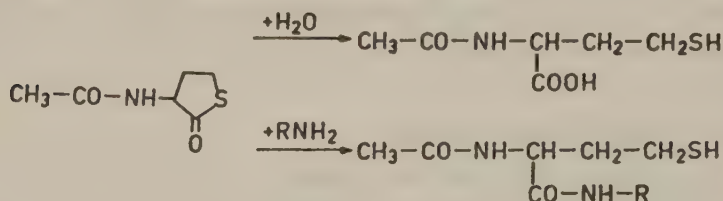
Die Thiolierungsreaktion kann an reaktiven Stellen des Proteinmoleküls erfolgen. Dies können Hydroxylgruppen des Serins, Threonins oder Tyrosins sein, Carboxylgruppen der Asparaginsäure, der Glutaminsäure oder die des C-terminalen Endes der Peptidkette oder Imino- und Aminogruppen des Arginins, Histidins, Lysins und des N-terminalen Endes der Peptidkette. Die Thiolierungsreaktion sollte unter möglichst milden Bedingungen erfolgen, um eine Zerstörung der Proteinstruktur zu vermeiden. Neben der Zerstörung der Quartär- und Tertiärstruktur gehören dazu auch Reaktionen der neu eingeführten SH-Gruppen mit schon im Molekül vorhandenen Disulfidbrücken in intra- oder intermo-

lekularen Disulfidwechsell.

In dieser Arbeit wurden Thiolierungsreaktionen benutzt, die an den freien Aminogruppen des Enzymmolekls angreifen: Die Thiolierung durch N-Acetyl-D,L-homocysteinthiolacton (AHTL) und durch Succinimidyl-3-(2-pyridyldithio)propionat (SPDP). Die Menge der ins Protein eingefhrten Thiolgruppen wurde mit DTNB bestimmt, als Bezugswert diente dabei eine genau bekannte Cysteinlssung.

3.2.2.1. Thiolierungsreaktionen mit AHTL

Die Reaktionen mit AHTL sind in vielen Varianten beschrieben worden^{3,77-82}. Neben thioliertem Enzym entsteht bei allen Reaktionen auch hydrolysiertes AHTL, das N-Acetyl-homocystein. Die Hydrolyse lsst sich gegenber der Aminolyse durch Wahl niedriger Reaktionstemperaturen zurckdrngen⁷⁸:



AHTL hat den groen Vorteil, in Wasser neutral zu reagieren und gut lslich zu sein. Die Zahl der ins Enzymmolekll eingefhrten Thiolgruppen lsst sich ber die Reaktionsdauer und den pH-Wert des Reaktionsgemisches steuern. Das Thiolierungsgemisch mu nach beendeter Reaktion aufgearbeitet werden, um das thiolierte Enzym rein zu gewinnen. Hier boten sich Dialyse, Ultrafiltration und Gelfiltration an. Die Gelfiltration wurde bevorzugt, da sowohl die Dialyse als auch die Ultrafiltration verhltnismssig lange Zeit beanspruchten. Deshalb mu te bei diesen Methoden durch Sre- oder Puffergaben der pH-Wert nach der Thiolierungsreaktion erniedrigt werden, um eine Eigenverdauung der Proteasen zu vermeiden. Dies fhrte aber in vielen Fllen zur Ausfllung der Proteine. Die Dialyseversuche wurden in Dialyseschlchten mit Ausschlu grenzen von 5000 g·Mol⁻¹ durchgefhr, indem die mit dem Thiolierungsgemisch gefllten Schlchte in etwa drei Liter Wasser von 4°C gehngt

wurden, welches durch Rührer in Bewegung gehalten wurde. Die Vollständigkeit der Dialyse wurde überprüft, indem dem Wasser Proben entnommen wurden, die mit DTNB auf freie SH-Gruppen untersucht wurden.

Die Ultrafiltration wurde in Zellen aus Polyamid oder Polycarbonat mit asymmetrischen Membranen der Ausschußgrenze $10000 \text{ g} \cdot \text{Mol}^{-1}$ als Filter bei einem Druck von 9 bar unter Rühren durchgeführt. Auch hier wurde die Filtration beendet, wenn im Filtrat mit DTNB keine Thiolgruppen mehr nachweisbar waren. Sowohl bei der Dialyse als auch bei der Ultrafiltration gingen große Mengen des Enzyms durch teilweise irreversible Fällung verloren.

Nach verschiedenen Vorversuchen zur Thiolierung mit AHTL wurde dann für alle Enzyme folgende Methode verwendet: 1,00 g des Proteins wurden in $20,0 \text{ cm}^3$ 0,0625 M Boratpuffer vom pH 10,45 bei 0°C unter leichtem Rühren gelöst. Bei der Thiolierung von Trypsin war dieser Puffer 0,10 M an Ca^{2+} ⁸²⁻⁸⁴, um die Selbstverdauung dieses Enzyms zu unterdrücken. Zur Enzymlösung wurden dann 0,50 g festes Imidazol und 1,00 g AHTL gegeben. Nach einer Reaktionszeit von 45 Minuten wurden nochmals 0,50 g AHTL zugesetzt. Nach insgesamt 120 Minuten wurde das Gemisch durch Gelfiltration an Sephadex G 25 bei 40°C aufgereinigt. Der Verlauf der Gelfiltration wurde durch Transmissionsmessung des Eluats der Säule bei 280 nm optisch verfolgt. Das reine thiolierte Enzym wurde anschließend lyophilisiert.

Die Ausbeute aus den Thiolierungsreaktionen wurde aus dem Gewicht des erhaltenen Lyophilisat ermittelt. Ein Vergleich der Extinktion des Lyophilisats in Wasser bei 280 nm mit der Extinktion einer Lösung des nativen Proteins zeigte bei Trypsin und beim Chymotrypsin Abweichungen. So ist für eine einprozentige α -Chymotrypsinlösung ein Extinktionswert von $E = 20,4$ angegeben ⁸⁵. Für thioliertes α -Chymotrypsin wurde im Mittel ein Wert von $E = 19,5$ gefunden. Ähnlich beträgt die Extinktion einer einprozentigen Trypsinlösung $E = 14,3$, während thioliertes Trypsin einen Wert von $E = 13,8$ aufwies. Auch die später zur Bestimmung von polymer gebundenem Protein verwendete Methode nach Folin und Ciocalteu ^{86,87} ergab für thiolierte Proteine geringere Extinktionswerte, als für die nativen Proteine.

Sämtliche der Thiolierung nachfolgenden Messungen (Aktivitätsbestimmung, Immobilisierungsausbeute) wurden auf das Gewicht des thiolierten Enzyms nach der Gefriertrocknung bezogen. In Tabelle 15 sind für α -Chymotrypsin Aktivität, Ausbeute und Thiolierungsgrad einiger Thiolierungsprodukte aufgeführt.

Tab.15. Eigenschaften einiger Chargen thiolierten α -Chymotrypsins

Chargennummer	erhaltene Aktivität (U·mg ⁻¹)	Ausbeute (Prozent)	Thiolierungsgrad ^a (Mol _{SH} ·Mol ⁻¹ Enzym)
tC 1	330	80	0,6
tC 2	220	68	1,2
tC 3	210	71	3,6
tC 4	196	80	3,9
tC 8	181	85	4,4
tC 9	179	80	1,0
tC 14	216	77	2,2
tC 16	237	58	5,7
tC 17	257	87	5,1
tC 18	252	87	5,4
tC 19	171	94	4,7
tC 20	209	80	3,6
tC 21	177	90	4,1
tC 23	175	81	4,1
tC 24	300	83	4,4
tC 25	215	87	3,5
tC 26	277	80	5,6

a: Der Thiolgruppengehalt der jeweiligen Charge des thiolierten Enzyms wurde durch Versetzen mit DTNB und Messung der optischen Dichte bei 412 nm bestimmt.

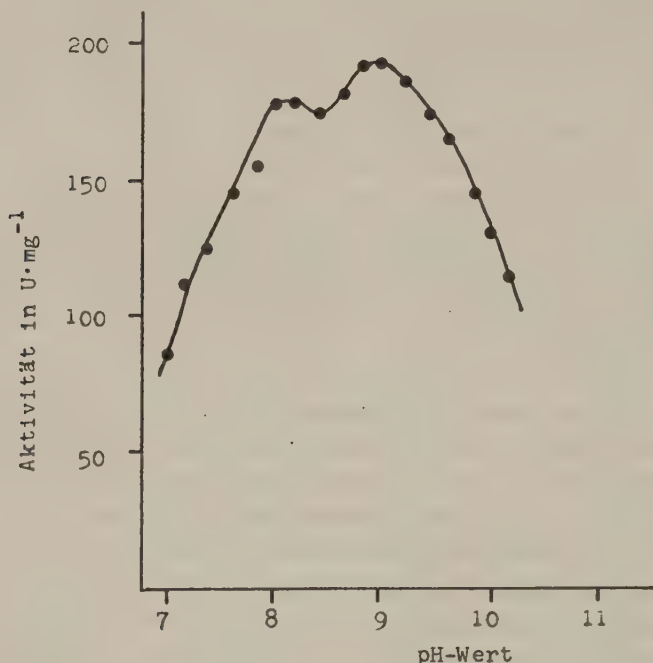
Der Mittelwert für die Thiolgruppen je Enzymmolekül beträgt hier 3,71 SH-Gruppen je Enzymmolekül. Der gemittelte Aktivitätswert ist 224 U·mg⁻¹, das sind 68 Prozent der Aktivität der eingesetzten α -Chymotrypsinchargen. Die mittlere Ausbeute der Thiolierungsreaktionen betrug 80 Prozent nach der Lyophilisation. Für den Verlust von jeweils etwa 20 Prozent der eingesetz-

ten Eiweißmenge sind Gelfiltration und Gefriertrocknung verantwortlich. Den stärksten Schwankungen von Thiolierungsansatz zu Thiolierungsansatz war die Aktivität des Produktes unterworfen. So haben die meisten Chargen noch etwa 75 bis 80 Prozent der Ursprungsaktivität, aber es gab sehr viele, die höhere und auch kleinere Werte aufwiesen. Es ist offensichtlich nötig, die Reaktionsbedingungen der Thiolierungsreaktion außerordentlich genau einzuhalten, wenn eine gleichbleibende Qualität des thiolierten Proteins erzielt werden soll. In einigen Fällen war das Enzym nach der Gefriertrocknung bei pH-Werten unter pH 6 oder bei höheren Elektrolytkonzentrationen nicht mehr löslich. Solche Chargen wurden nicht weiterverwendet und sind in Tabelle 15 ausgelassen.

Bis auf wenige Ausnahmen (zum Beispiel die Chargen tC 9 und tC 14) war das pH-Profil der Enzymaktivität des thiolierten Enzyms identisch mit dem des nicht thiolierten Enzyms. Bei diesen Ausnahmen wurde zunächst eine Verbreiterung des Aktivitätsprofils beobachtet. Genauere Untersuchungen ergaben Aktivitätsmaxima bei zwei verschiedenen pH-Werten (Abbildung 18). Dies wird vielleicht durch die Substitution von Aminogruppen in der Nähe des aktiven Zentrums des Enzymmoleküls verursacht. Durch Disulfidwechsel können sich die räumlichen Abstände einiger Gruppen geändert haben oder durch den Austausch von Aminogruppen gegen Thiolgruppen die Art und Menge ionisierter Gruppen bei einem bestimmten pH-Wert^{88,89}.

Die Ergebnisse der Thiolierung von Trypsin in Tabelle 16 ergaben, ähnlich wie beim α -Chymotrypsin, bei einer mittleren Ausbeute von 71 Prozent einen Aktivitätserhalt von 63,3 Prozent. Allerdings ist die Menge der ans Enzym gebundenen SH-Gruppen geringer (im Mittel 1,3 SH-Gruppen je Enzymmolekül). Das ist vielleicht darauf zurückzuführen, daß Trypsin nur zwei Argininreste im Molekül enthält, während α -Chymotrypsin davon drei aufweist (Tabelle 14). Wegen der Ähnlichkeit von Trypsin und α -Chymotrypsin verliefen auch die Thiolierungsreaktionen ähnlich: Auch beim Trypsin wurden bisweilen Enzymchargen erhalten, die nach der Gefriertrocknung entweder in Wasser nicht mehr löslich waren oder schon durch geringe Salzkonzentrationen ausfielen.

Abb.18. pH-Profil der Aktivität von thioliertem α -Chymotrypsin (tC 9)



Aktivitätsmessung:

pH-statisch mit 0,10 M Natronlauge bei 25°C in 11,0 cm³
 0,020 M ATEE (0,020 M an TRIS·HCl und 0,200 M an NaCl)
 mit je 25,6 µg Enzym in 0,100 cm³ Lösung.

Ebenso wurde bei einigen Chargen das Auftreten eines zweiten pH-Maximums der Aktivität (Abbildung 19) beobachtet. Die Verminderung der Löslichkeit des Enzyms trat beim Trypsin wesentlich häufiger auf, als beim α -Chymotrypsin. Einmal wird das darauf zurückzuführen sein, daß Disulfidbrücken im Trypsin leichter reduzierbar sind, als im α -Chymotrypsin^{90,91}; durch die Aufhebung von ionischer Bindung oder der Wasserstoffbrückenbindung in dem Protein durch die hohen Ionenstärken bei der Thiolierung ist dann eine Auffaltung des Enzyms möglich, was einen starken Aktivitätsverlust bewirkt. Ebenso nimmt auch hier die Anzahl der ionisierbaren Gruppen im Molekül durch Substitution von Amino-gruppen durch Thiolgruppen ab. Schließlich besteht α -Chymotrypsin aus drei durch Disulfidbrücken verbundenen Proteinsträngen

Tab.16. Eigenschaften einiger Chargen thiolierten Trypsins

Chargennummer	erhaltene Aktivität ($\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$)	Ausbeute (Prozent)	Thiolierungsgrad ^a ($\text{Mol}_{\text{SH}} \cdot \text{Mol}_{\text{Enzym}}^{-1}$)
tT 2	31,5	100	0,2
tT 3	32,3	85	1,9
tT 6	28,4	57	0,9
tT 11	20,0	60	0,1
tT 12	32,1	47	1,3
tT 13	29,3	63	2,5
tT 14	22,6	86	2,1

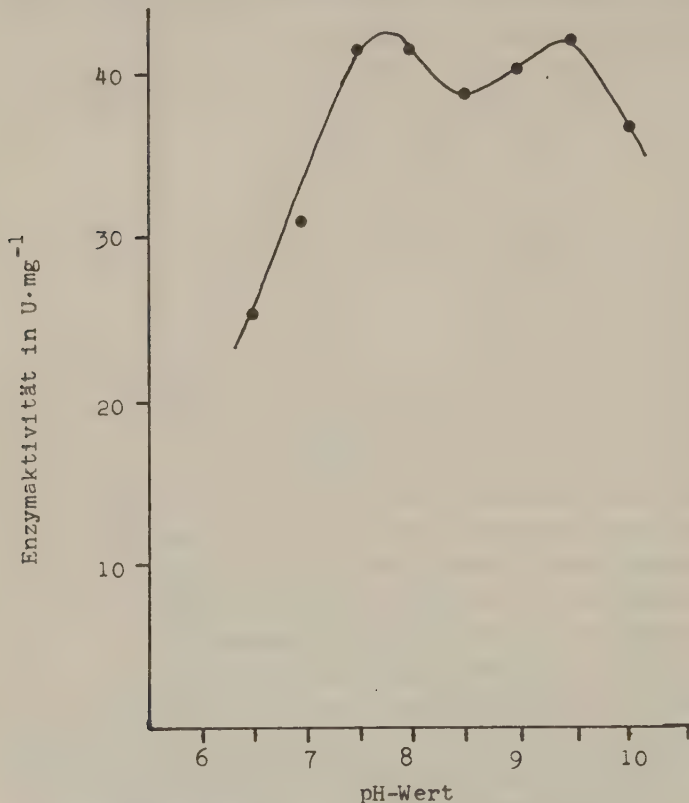
a: Der Thiolgruppengehalt der jeweiligen Charge des thiolierten Enzyms wurde durch Versetzen mit DTNB und Messung der optischen Dichte bei 412 nm bestimmt.

und Trypsin nur aus einem einzigen^{89,92}: Zerstörung der Sekundär- und Tertiärstruktur des Proteins führt beim α -Chymotrypsin zu Bruchstücken, die per Gelfiltration abgetrennt werden können, während sich beim Trypsin solche Bruchstücke nicht bilden können. Allerdings waren solche Fragmente bei der Gelfiltration in den Elutionsdiagrammen nicht erkennbar.

Ribonuclease ließ sich mit AHTL problemlos thiolieren und ergab bei 85 Prozent Ausbeute eine Enzymcharge mit einer Aktivität von $16,94 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ (Aktivität des eingesetzten Enzyms $18,73 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$), also 90,4 Prozent der ursprünglichen Aktivität. Es konnten 3,78 Thiolgruppen im Mittel in jedes R-Nase-Molekül eingeführt werden, also etwas mehr als beim α -Chymotrypsin. Das R-Nase-Molekül enthält vier Argininreste.

Lysozym war durch AHTL mit der zuvor beschriebenen Methode nicht thiolierbar: Das Protein wurde irreversibel gefällt. Es wurde deshalb untersucht, unter welchen Bedingungen eine solche Trübung oder Fällung auftritt. Dazu wurde eine kleine Menge Lysozym in Puffern von verschiedenen Ionenstärken und pH-Werten gelöst und dann AHTL oder Imidazol als Puffer oder beide Substanzen zugegeben. Es erwies sich, daß eine Fällung des Lysozyms nur in Gegenwart von AHTL erfolgt. Bei hohen pH-Werten entsteht diese Fällung fast sofort nach AHTL-Zugabe. Imidazol verstärkt das Ausmaß der Fällung. Ohne Imidazol bleibt die Fällung bei pH-Werten unter pH 9,5 ganz aus, allerdings wurde unter diesen Bedin-

Abb. 19. pH-Profil der Aktivität von thioliertem Trypsin

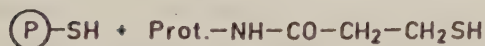
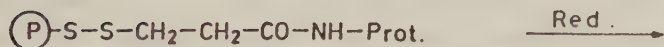
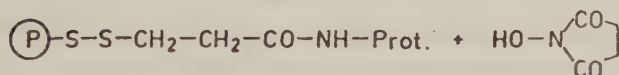
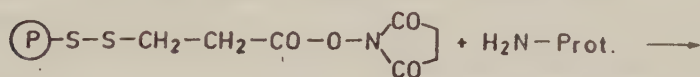
**Aktivitätsmessung:**

pH-statisch mit 0,10 M Natronlauge bei 25°C in 21,0 cm³
 0,010 M BAEE (0,010 M an TRIS·HCl und 0,100 M an NaCl).

gungen auch keine Thiolierung des Lysozyms erreicht. Wurden trübe Thiolierungsansätze durch Zentrifugieren geklärt, so ergab sich, daß die überstehende Lösung nur nicht-thioliertes Enzym enthielt. Da das gefällte Enzym weder bei sehr hohen noch bei sehr kleinen pH-Werten gelöst werden konnte und da sowohl kleine als auch große Ionenstärken keine Auswirkung auf die Löslichkeit zeigten, wurde vermutet, daß beim Lysozym wegen der hohen Zahl an Argininresten im Molekül die Thiolierung zur intermolekularen Vernetzung führt. Sowohl beim Lysozym wie auch beim α -Chymotrypsin und beim Trypsin besaßen die Präzipitate hohe enzymatische Aktivität.

3.2.2.2. Thiolierung mit polymer gebundenem N-Succinimidyl-3-thiopropionat

Die Thiolierung von α -Chymotrypsin mit den polymeren Thiolierungsreagenzien I und II wurde bei Raumtemperatur in Hydrogencarbonatlösung ausgeführt. Dabei wurde das Enzym zunächst an den Reagenzien immobilisiert und konnte bei Bedarf durch milde Reduktion vom Träger abgespalten werden:



Das auf diese Weise thiolierte Enzym enthält dann mindestens eine freie Thiolgruppe.

Die Menge des an die Thiolierungsreagenzien I und II gebundenen α -Chymotrypsins wurde hier optisch durch Absorption bei 278 nm bestimmt. Es zeigte sich, daß das Reagenz I auf Poly(vinylalkohol)-Basis kaum Enzym immobilisieren konnte, während Reagenz II in der Lage war, 103 mg α -Chymotrypsin je Gramm trockenes Polymeres zu binden. So konnten 30 g des gequollenen Reagenz II (Quellungsfaktor 25) von 300 mg an angebotenen α -Chymotrypsin 124 mg fixieren. Das erhaltene Immobilisat hatte eine Aktivität gegen ATEE von insgesamt 8304 U, das sind 67 U je mg gebundenes Enzym. Das an Thiolierungsreagenz II gebundene α -Chymotrypsin wies also noch 20,3 Prozent seiner ursprünglichen Aktivität auf.

Das Immobilisat wurde in Hydrogencarbonatlösung mit 2-Mercap-

toethanol reduziert. Das Harz wurde dann gewaschen, bis es keine enzymatische Aktivität mehr aufwies und die Waschlösung per Ultrafiltration durch eine Membran mit einer Ausschlußgrenze von $10000 \text{ g} \cdot \text{Mol}^{-1}$ eingeeengt. Gelfiltration auf Sephadex G 25 reinigte das Enzym von niedermolekularen Beimengungen. Es wurden $17,8 \text{ mg}$ Substanz mit einer enzymatischen Aktivität von 5213 U erhalten, also mit einer spezifischen Aktivität von $293 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$. Ihr Thiolgruppengehalt wurde mit DTNB zu $1,16 \mu \text{Mol}$ bestimmt. Unter der Annahme, daß das isolierte Produkt reines α -Chymotrypsin war, dessen Molgewicht etwa $25000 \text{ g} \cdot \text{Mol}^{-1}$ beträgt, errechnet sich der Gehalt an Thiolgruppen eines Enzymmoleküls zu durchschnittlich 1,5.

Mit Ausnahme der Gelfiltration wurden alle Reaktionsschritte bei 22°C durchgeführt. Die Ausbeute an thioliertem Enzym entsprach $5,9$ Prozent der eingesetzten Enzymmenge. $58,7$ Prozent des Enzyms sind vom Harz nicht gebunden worden und $35,4$ Prozent sind während der Aufreinigungsschritte verloren gegangen, möglicherweise durch Selbstverdauung des Enzyms in kleine abtrennbare Bruchstücke. Nachteile dieser Thiolierungsmethode gegenüber anderen Methoden in homogener Phase entstehen dadurch, daß hier zunächst das Polymere und das Thiolierungsreagenz miteinander verknüpft werden müssen. Die geringe Kapazität des verwendeten Polymeren und die geringe Ausbeute würden zur Thiolierung von größeren Proteinmengen zu sehr hohen Harz- und Flüssigkeitsvolumina führen, aus denen dann das thiolierte Protein abgetrennt werden müßte. Ein Vorteil dieser Methode ist die Möglichkeit, thioliertes Enzym am Polymeren zu speichern und erst bei Bedarf abzulösen. Die Thiolierung mit polymeren Reagenzien stellt außerdem sicher, daß kein nichtthioliertes Proteinmolekül das Polymere verläßt. Eine Mehrfachthiolierung, die durch mehrfache Bindung eines Proteinmoleküls am Harz entsteht, kann allerdings nicht ausgeschlossen werden.

Ein Kompromiß zwischen der Thiolierung mit einem polymeren Thiolierungsreagenz und der Thiolierung in homogener Phase wird erreicht, wenn das Enzym zunächst, zum Beispiel mit AHTL, in Lösung thioliert wird und anschließend durch kovalente Chromatografie an einem Träger mit SH-Gruppen das thiolierte Enzym vom nicht thiolierten abgetrennt wird. Die praktische Durchführung der kovalenten Chromatografie zur Abtrennung von nicht

thiolisiertem α -Chymotrypsin aus einem Thiolierungsansatz wird im Abschnitt 3.3.2.8. beschrieben.

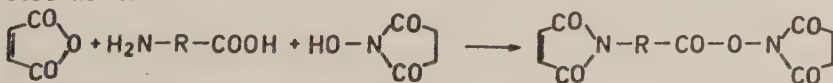
3.2.3. Einführung von Maleinimidgruppen in Enzymmoleküle

Nachträglich in Proteine eingeführte Thiolgruppen verändern die Eigenschaften der Proteine bisweilen gravierend. Zu den Reaktionen der Thiolgruppen gehören Wechselwirkungen mit schon im Eiweißmolekül vorhandenen Disulfidbrücken, die Instabilität, die durch deren leichte Oxidierbarkeit hervorgerufen wird, die Reaktivität gegenüber Schwermetallen und ihre Wirkung als schwache Säuren. Thiolisierte Proteine ändern deshalb ihre Löslichkeitseigenschaften, ihre Aktivität gegenüber bestimmten Substratmolekülen oder den pH-Wert ihrer maximalen Aktivität.

Wegen dieser Nachteile der Thiolierung wurde versucht, Enzyme mit der neutralen und oxidationsbeständigen Maleinimidgruppe zu versehen. Derart modifizierte Proteinmoleküle können unter geeigneten Bedingungen spezifisch an Harze mit Thiolgruppen gebunden werden. Es besteht ebenfalls die Möglichkeit, Proteinmoleküle mit Maleinimidfunktionen mit anderen Proteinen zu verknüpfen, die SH-Gruppen tragen²¹⁻²⁵.

Da die Maleinimidgruppen im Alkalischen nicht beständig sind^{6,7} und bei höheren pH-Werten auch mit Aminogruppen reagieren können^{16,17}, muß während und nach der Maleinimidierung der Proteinmoleküle im neutralen oder sauren Bereich gearbeitet werden.

Ein Reagenz zur Einführung von Maleinimidgruppen in Enzymmoleküle sollte einerseits die Maleinimidgruppe enthalten, andererseits unter milden Reaktionsbedingungen in wäßriger Lösung mit Aminogruppen des Enzyms reagieren. Deshalb wurde versucht, aus den Aminogruppen von Aminocarbonsäuren die Maleinimidgruppen mit Maleinsäureanhydrid darzustellen und die Carboxylgruppen dieser Säuren mit N-Hydroxysuccinimid in aktive Ester zu überführen:



Die Versuche, die Maleinimidfunktion aus den Aminogruppen zu erhalten, verliefen aber nur bei wenigen Aminosäuren, zum Beispiel bei der 4-Aminobenzoesäure, erfolgreich. Deshalb wurde versucht, die Maleinimidfunktion auf andere Weise zu erhalten. Unter den

vielen Möglichkeiten, zu der Maleinimidgruppe zu gelangen⁹³⁻⁹⁵, schien die Reaktion von Aminogruppen mit N-Ethoxycarbonylmaleinimid den größten Erfolg zu versprechen⁹⁶:

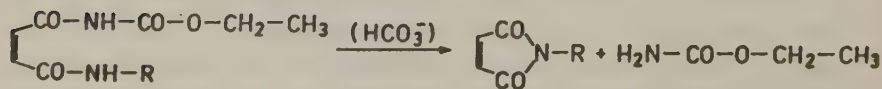


Diese Methode, aus Aminogruppen Maleinimidfunktionen zu bilden, führte auch bei den Aminosäuren zum Erfolg, wo die Acylierung mit Maleinsäureanhydrid und der Ringschluß zum Imid mit Essigsäureanhydrid überhaupt keine Resultate brachte (zum Beispiel bei der 4-Aminobuttersäure).

Die bereitwillige Reaktion des N-Ethoxycarbonylmaleinimids (ECM) mit den Aminogruppen der Aminosäuren legte es nahe, eine Einführung der Maleinimidgruppen ins Protein direkt mit ECM zu versuchen.

3.2.3.1. Maleinimidierung von Enzymen mit N-Ethoxycarbonylmaleinimid (ECM)

ECM reagiert mit Aminen in wässrigen Lösungen unter der katalytischen Wirkung von Hydrogencarbonationen in einer zweistufigen Reaktion zu einem N-alkylierten Maleinimiderivat:



Das Hydrogencarbonat katalysiert hier die Bildung des Maleinimidrings und sollte den pH-Wert der Lösung konstant halten. Bei allen Reaktionen mit ECM, sowohl mit Aminosäuren als auch mit Proteinen, entstand aus dem Hydrogencarbonat Kohlendioxid. Wegen der geringen, in Wasser löslichen Menge an Natriumhydrogencarbonat bestand die Gefahr, daß die in den Reaktionsansätzen gelöste Menge an Hydrogencarbonat nicht ausreichend war. Eine Vergrößerung der HCO_3^- -Menge war nur durch Vergrößerung

des Reaktionsvolumens möglich. Deshalb mußte bei allen Reaktionen der Enzyme mit ECM ein Kompromiß zwischen Volumen und ECM-Menge geschlossen werden.

Die Reaktionen der Enzyme mit ECM wurden nach einer Stunde abgebrochen, da dann die meisten Maleinimidgruppen ans Enzym gebunden waren und danach ein leichter Aktivitätsverlust der Enzyme zu beobachten war. Die Enzymlösungen wurden dann, wie bei den Thiolierungsreaktionen, per Gelfiltration gereinigt und das Enzym gefriergetrocknet. Die Anzahl der an jedem Enzymmolekül gebundenen Maleinimidgruppen wurde indirekt durch Versetzen mit einer bekannten Cysteinlösung und Bestimmung des überschüssigen Cysteins mit DTNB ermittelt. Alle Chargen der maleinimidierten Enzyme waren, im Gegensatz zu den thiolierten Enzymen, gut in Wasser oder in Elektrolytlösungen löslich.

Tabelle 17 zeigt Ausbeute, Maleinimidgruppengehalt und Aktivität von maleinimidiertem α -Chymotrypsin. Zur Darstellung dieser Präparate wurden bei jeder Reaktion 0,50 g des Enzyms eingesetzt und die ECM-Menge zwischen 0,25 g und 1,00 g variiert. Die modifizierten Enzyme zeigten starke Schwankungen in der Menge der ins Enzym eingeführten Maleinimidgruppen. Es ist die Tendenz zu erkennen, daß mit steigender ECM-Menge im Reaktionsansatz die Enzymaktivität abnimmt und die Ausbeute an Enzym zunimmt.

Tab.17. Ergebnis der Maleinimidierung von α -Chymotrypsin durch ECM mit verschiedenen ECM-Mengen^a

Chargen- nummer	ECM-Menge (g)	Ausbeute (Prozent)	erhaltene Akti- vität ($\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$)	Maleinimidierungs- grad ^b ($\text{Mol}_{\text{MI}} \cdot \text{Mol}_{\text{Enz}}^{-1}$)
mC 1	0,25	82	230	9,8
mC 2	0,50	78	206	12,4
mC 4	0,75	88	127	5,9
mC 5	1,00	99	158	4,8
mC 6	1,00	96	140	9,0
mC 7	1,00	98	212	4,1

a: Es wurden bei diesen Untersuchungen jeweils 0,50 g Enzym eingesetzt.

b: Bestimmt durch Versetzen mit Cystein und Messung überschüssigen Cysteins mittels DTNB.

Wegen der unterschiedlichen Mengen der in die Enzymmoleküle eingeführten Maleinimidgruppen wurde vermutet, daß das Hydrogencarbonat in einigen Fällen nicht ausgereicht hat. Es wurde deshalb in einer weiteren Versuchsserie eine konstante ECM-Menge von 0,50 g eingesetzt und die Menge an Enzym variiert. In Tabelle 18 sind die erhaltenen maleinimidgruppenhaltigen Enzymchargen aufgeführt. Hier ist ein deutlicher Zusammenhang zwischen dem Verhältnis Enzym/ECM und der Menge an enzymgebundenen Maleinimidgruppen zu erkennen.

Tab. 18. Ergebnis der Maleinimidierung von α -Chymotrypsin durch ECM bei verschiedenen Enzymmengen^a

Chargen- nummer	Enzym-Men- ge (g)	Ausbeute (Prozent)	erhaltene Akti- vität ($\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$)	Maleinimidierungs- grad ^b ($\text{Mol}_{\text{MI}} \cdot \text{Mol}_{\text{Enz}}^{-1}$)
mC 8	0,15	94	205	3,3
mC 9	0,25	92	201	2,1
mC 10	0,35	86	219	2,1
mC 11	0,45	99	248	1,1

a: Es wurden bei diesen Untersuchungen jeweils 0,50 g ECM eingesetzt.

b: Der Maleinimidierungsgrad wurde durch Versetzen einer Probe mit einem Überschuß an Cystein und Messung der Menge des nicht verbrauchten Cysteins mit DTNB ermittelt.

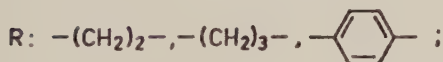
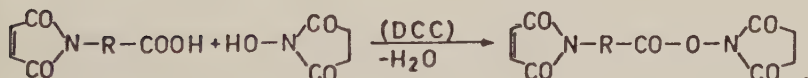
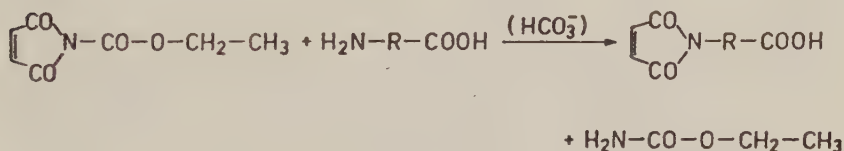
Aus den Tabellen 17 und 18 ist ebenfalls zu erkennen, daß die Ausbeute an modifiziertem Enzym sehr hoch ist. Daraus kann man entnehmen, daß Maleinimid- oder Maleinsäureamidgruppen einen hohen Anteil am Gewicht des erhaltenen Enzyms haben müssen. Da die Aktivität der Produkte zum Teil stark herabgesetzt ist, kann man annehmen, daß die maleinimidierten Enzyme teilweise verunreinigt vorliegen. Da diese Verunreinigungen nicht mit Cystein reagiert haben, wurde vermutet, daß bei der Reaktion mit ECM Nebenprodukte entstehen, die dann adsorptiv am Enzymmolekül gebunden sind.

Das pH-Profil der Aktivität der erhaltenen maleinimidierten Enzymchargen war in allen Fällen identisch mit dem pH-Profil der Aktivität des nicht modifizierten Enzyms.

Die Maleininimidierung von Trypsin führte zu weniger gut löslichen Produkten. Die Aktivität erreichte $16.9 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ bei 10.9 Maleininimidgruppen im Enzymmolekül. Dabei betrug die Ausbeute an maleininimidiertem Trypsin etwa 60 Prozent.

3.2.3.2. Maleininimidierung von α -Chymotrypsin mit reaktiven N-Maleininimidocarbonsäureestern

N-Maleininimidocarbonsäuren konnten aus Aminocarbonsäuren und ECM in gesättigter Hydrogencarbonatlösung synthetisiert werden: Die freie Carboxylgruppe wurde mit N-Hydroxysuccinimid in Gegenwart von N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid verestert:



Wegen ihrer geringen Löslichkeit in Wasser wurden alle aktiven Ester als fünfprozentige Lösungen in N,N-Dimethylformamid zur Reaktion mit dem Enzym eingesetzt. Die Maleininimidierungsreaktion wurde in 0,10 M Natriumhydrogencarbonatlösung durchgeführt. Während der Reaktion fiel überschüssiges Maleininimidierungsreagenz in fester Form aus dem Reaktionsgemisch aus. Es konnte per Zentrifugation abgetrennt werden. Das maleininimidierte Enzym wurde nach der Reaktion durch Gelfiltration gereinigt und gefriergetrocknet. In Tabelle 19 sind die Eigenschaften von zwei Chargen maleininimidierten α -Chymotrypsins aufgeführt, die nach der beschriebenen Methode dargestellt wurden. Das maleininimidierte Enzym wies bei normaler Ausbeute eine hohe Aktivität auf. Die Anzahl der eingeführten Maleininimidgruppen war hoch. Dabei war

beim pH-Profil der Aktivität keine Abweichung von dem pH-Profil des nativen Enzyms zu erkennen. Das nach dieser Methode maleinimierte α -Chymotrypsin hatte nach der Modifizierungsreaktion seine Löslichkeit in Wasser nicht geändert.

Tab. 19. Ergebnis der Maleinimidierung von α -Chymotrypsin durch einen Maleinimidocarbonsäureester^a

Chargen- nummer	Ausbeute (Prozent)	erhaltene Akti- vität ($\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$)	Maleinimidierungsgrad ($\text{Mol}_{\text{MI}} \cdot \text{Mol}^{-1}_{\text{Enzym}}$)
mC 19	72,7	296	11,5
mC 20	73,7	269	9,7

a: Zur Maleinimidierung wurden 0,10 g Succinimidyl-(4-maleinimido)-buttersäure in 2,00 cm³ N,N-Dimethylformamid eingesetzt. Die Reaktionen wurden bei Raumtemperatur mit 0,50 g Enzym eine Stunde lang in 10,0 cm³ 0,100 M Natriumhydrogencarbonatlösung ausgeführt.

3.3. Immobilisierungsreaktionen

Mit Hilfe der Immobilisierung von Biokatalysatoren erhält man Systeme, die aus dem Reaktionsmedium leicht abtrennbar sind und die deshalb wiederverwendbar sind. Die Immobilisierung erhöht die Stabilität der Katalysatoren und in vielen Fällen auch ihre thermische Beständigkeit. Nach der Immobilisierung lassen sich die Katalysatoren in kontinuierlichen Verfahren einsetzen.

Die Immobilisierung der Enzyme erfolgt meist durch Verbindung mit einem wasserunlöslichen Stoff. Hier wurden als Träger reaktive Polymere verwendet, die durch Modifizierung von vorgefertigten Harzen oder durch Copolymerisation von niedermolekularen Verbindungen entstanden sind; die Verknüpfung der Enzyme mit diesen Trägern soll über kovalente Bindungen erfolgen und nicht reversibel sein. In dieser Arbeit sollten SH-haltige Enzyme selektiv an Träger mit Maleinimidgruppen immobilisiert werden und untersucht werden, bei welchen Reaktionsbedingungen die Immobilisierungsreaktion optimal wird. Dazu wurden die Auswirkungen einiger Reaktionsbedingungen auf das Ergebnis der Immobilisierung untersucht. Ziel dieser Untersuchungen war es, eine hohe Immobilisierungsausbeute zu erreichen, also hohe Mengen an Protein an die reaktiven Träger zu binden und dabei hohe enzymatische Aktivität der Immobilisate zu erhalten.

Die enzymatische Aktivität eines immobilisierten Enzymmoleküls bezogen auf die Aktivität des zur Immobilisierung eingesetzten löslichen Enzyms wird als relative Aktivität bezeichnet und in Prozent der ursprünglichen Aktivität angegeben.

Die Menge des von den Trägern gebundenen Enzyms wurde entweder direkt aus der optischen Dichte der jeweiligen Enzymlösung berechnet oder indirekt aus der Differenz zwischen angebotener und nicht vom Harz gebundener Proteinmenge nach Folin-Ciocalteu ermittelt^{86,87}. Eine Bestimmung des gebundenen Proteins mit Coomassie Blue G 250 war wegen der bisweilen auftretenden Fällung des Enzyms in dem zur Bestimmung nötigen sauren Milieu nicht möglich⁹⁶⁻⁹⁸.

3.3.1. Immobilisierung thiolgruppenhaltiger Proteine an reaktive Träger auf der Basis von Poly(vinylalkohol)

Poly(vinylalkohol) ist als Trägermaterial aus mehreren Gründen gut geeignet. Das Polymere ist leicht und in gleichbleibender Qualität erhältlich. Das wasserlösliche Polymer ist reproduzierbar zu vernetzen. Eigenschaften wie Quellbarkeit, Gehalt an reaktiven Gruppen und mechanische Stabilität sind durch die Reaktionsbedingungen bei der Darstellung reaktiver Träger einstellbar. Die Harze sind neutral und ebenso die aus ihnen dargestellten reaktiven Träger, es sind also keine unspezifischen ionischen Wechselwirkungen der Enzyme mit der Polymermatrix zu erwarten.

3.3.1.1. Untersuchung der Wirkung von Sauerstoff auf das Immobilisierungsergebnis

Thiolierte Proteine können durch Oxidation über Disulfidbrücken intermolekular vernetzt werden^{28,82,99}. Die Reaktion von Luftsauerstoff mit SH-Gruppen in Proteinen wird ebenfalls ausgenutzt, um reduzierte Proteine nach ihrer Rückfaltung wieder zu oxidieren. Die Oxidation vermindert also den Gehalt an für die Immobilisierung nötigen SH-Gruppen und erhöht gleichzeitig stark das Molekulargewicht des verfügbaren Proteins durch intermolekular erzeugte Disulfidgruppen. Einer intramolekularen Verknüpfung von Thiol- zu Disulfidgruppen müßte eine Auffaltung des Proteinmoleküls vorausgehen. Dies würde wahrscheinlich zu Aktivitätsverlusten des Enzyms führen.

Die Dauer einer Immobilisierungsreaktion wurde selten über vier Stunden hinaus ausgedehnt. Deshalb wurde die Wirkung des Sauerstoffs bei einer vierstündigen Immobilisierungsreaktion untersucht. Dazu wurden unter gleichen Bedingungen eine Immobilisierung unter Sauerstoff und eine unter Stickstoff durchgeführt. Während der Reaktion wurde ein pH-Wert von pH 6,0 durch ein Puffersystem aus 0,20 M Borsäure, 0,20 M Essigsäure, 0,20 M Phosphorsäure und 1,00 M Natronlauge (Puffer nach Britton-Robinson) gehalten und eine Temperatur von 0°C durch ein Eiswasserbad eingestellt. Das Volumen der gepufferten Lösung von

thioliertem α -Chymotrypsin (tc 23) betrug $3,60 \text{ cm}^3$. Die Lösung war 1,10 oder 2,20-prozentig an Enzym. Die verwendete Pufferlösung war vor den Versuchen durch Einleiten von Stickstoff oder Sauerstoff mit dem betreffenden Gas gesättigt worden. In Tabelle 20 sind als Ergebnis Aktivität, immobilisierte Enzymmenge und daraus errechnete relative Aktivität der erhaltenen Immobilisate mit dem Träger 3 vorgestellt.

Tab.20. Immobilisierung von thioliertem α -Chymotrypsin (tc 23) am Träger 3 in Sauerstoff- und Stickstoffatmosphäre

Enzymkonzentration (Prozent)	gebundene Enzymmenge ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)	Aktivität ($\text{U} \cdot \text{g}^{-1}$)	relative Aktivität (Prozent)	Gas
1,10	78,2	694	5,07	O_2
2,20	82,8	702	4,84	O_2
1,10	82,0	679	4,73	N_2
2,20	76,2	693	5,20	N_2

Bedingungen bei den Immobilisierungsreaktionen:

Je etwa 50 mg Träger 3 und 40,02 mg thioliertes α -Chymotrypsin (tc 23) in $3,60 \text{ cm}^3$ Britten-Robinson-Puffer pH 6,0 wurden vier Stunden bei 0°C durchmischt. Die gebundenen Enzymmengen wurden nach Folin-Ciocalteu bestimmt, die Aktivitäten durch pH-statistische Titration bei 25°C und pH 8,5 mit 0,10 M Natronlauge.

Aus der Tabelle sind keine nennenswerten Unterschiede zwischen den Immobilisierungsreaktionen in Sauerstoff- oder Stickstoffatmosphäre zu erkennen.

3.3.1.2. Zeitabhängigkeit der Immobilisierungsreaktion

Um den Einfluß von Reaktionsbedingungen zu untersuchen, sollte zunächst die optimale Reaktionsdauer ermittelt werden. Sie hängt von der Art des verwendeten Trägers, von der Temperatur, dem pH-Wert und der Konzentration der Reaktionspartner sowie vom eingesetzten Enzym ab. Bei der Immobilisierung von proteolytischen Enzymen ist nicht nur die Geschwindigkeit der Immobilisierungsreaktion relevant, sondern auch die Geschwindigkeit, mit der sich das Enzym selbst verdaut. Mit zunehmender Reaktionsdauer werden also auch kleine inaktive Bruchstücke des Enzyms immobilisiert

werden. Dadurch nimmt zwar die Menge an gebundenem Protein weiter zu, aber die Aktivität der erhaltenen Immobilisate steigt nicht im gleichen Maße an. Durch Spaltung von schon immobilisiertem Enzym durch noch gelöstes Enzym kann bei sehr langen Reaktionszeiten sogar mit einem Rückgang der Aktivität des Immobilisats gerechnet werden.

Die zeitliche Abhängigkeit der Immobilisierungsreaktion wurde untersucht, indem zu sechs fast gleich großen Harzmengen (je etwa 50 mg Träger 3) bei 0°C und pH 6,0 genau $1,30 \text{ cm}^3$ der 1,5-prozentigen Enzymlösung (tC 23) gegeben wurde. Die Enzymmenge je Ansatz betrug also 19,81 mg. Auch hier wurde der pH-Wert bei der Immobilisierungsreaktion durch ein Puffersystem nach Britton-Robinson eingestellt. In Abbildung 20 ist die zeitliche Abhängigkeit der gebundenen Enzymmenge und der relativen Aktivität der erhaltenen Immobilisate grafisch dargestellt. In Tabelle 21 ist außerdem noch die Aktivität der Immobilisate mit aufgeführt.

Tab. 21. Zeitliche Abhängigkeit von immobilisierter Enzymmenge. Aktivität und relativer Aktivität bei der Immobilisierung von thiolisiertem α -Chymotrypsin am Träger 3.

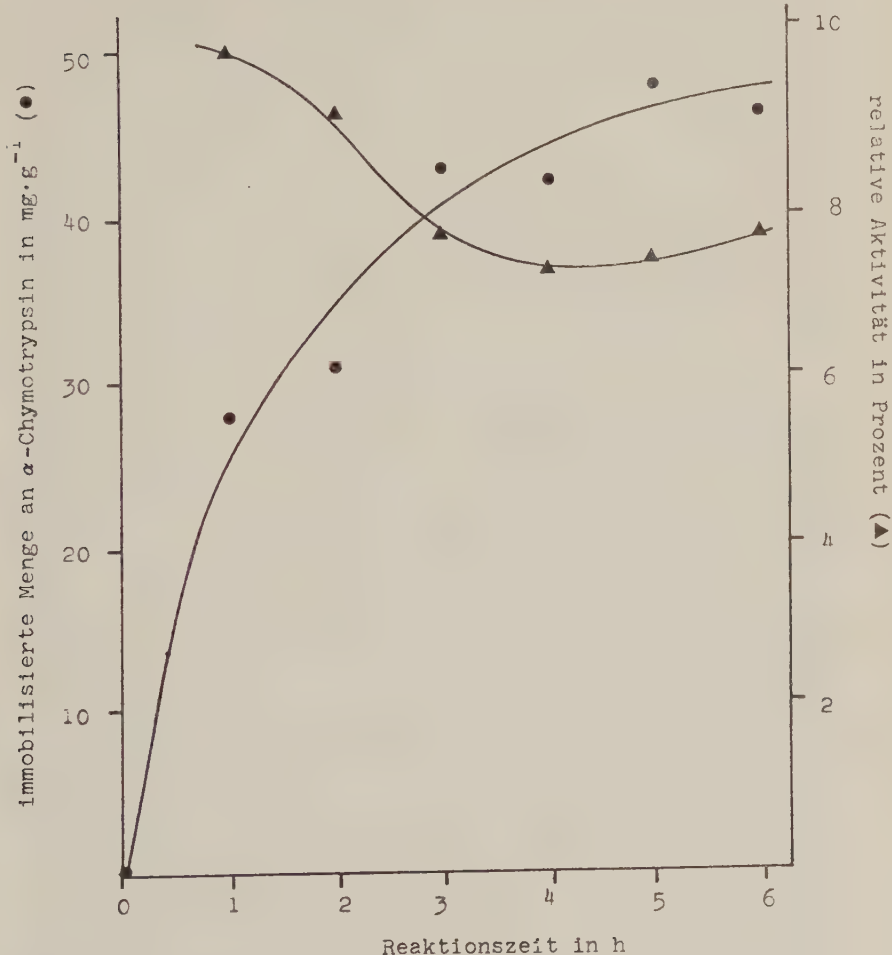
Reaktions- zeit (h)	gebundene Enzym- menge ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)	Aktivität ($\text{U} \cdot \text{g}^{-1}$)	relative Aktivität (Prozent)
1	28,3	495	9,99
2	31,3	510	9,37
3	43,2	596	7,89
4	42,9	554	7,38
5	48,5	636	7,49
6	46,4	641	7,89

Bedingungen bei den Immobilisierungsreaktionen:

Je etwa 50 mg Träger 3 wurden mit 19,81 mg thiolisiertem α -Chymotrypsin (tC 23) in $1,30 \text{ cm}^3$ Britton-Robinson Puffer pH 6,0 bei 0°C durchmischt. Die gebundenen Enzymmengen wurden nach Folin-Ciocalteu bestimmt, die Aktivitäten durch pH-statische Titration bei 25°C und pH 8,5 mit 0,10 M Natronlauge.

Es ist gut zu erkennen, daß hier nach drei Stunden keine weitere Aufnahme von Enzym durch das Harze erfolgte. Während der ersten zwei Stunden fiel die relative Aktivität von zehn auf acht Pro-

Abb.20. Zeitliche Abhängigkeit von immobilisierter Enzymmenge und relativer Aktivität bei der Immobilisierung von thiolisiertem α -Chymotrypsin (tC 23) an Träger 3.



Bedingungen bei den Immobilisierungsreaktionen:

Je etwa 50 mg Träger 3 und 19,81 mg thiolisiertes α -Chymotrypsin (tC 23) wurden in 1,30 cm^3 Britton-Robnison-Puffer pH 6,0 bei 0°C durchmischt. Die immobilisierten Enzymen wurden nach Folin-Ciocalteu bestimmt, die Aktivitäten durch pH-statistische Titration bei 25°C und pH 8,5 mit 0,10 M Natronlauge.

zent und stabilisiert sich dann, so daß bei längerer Immobilisierungsdauer mit höherer gebundener Enzymmenge auch die Aktivität des erhaltenen Immobilisats ansteigt. Dieses Verhalten deutet nicht auf eine Selbstverdauung des Enzyms hin. Sie sollte zu einer weiteren Abnahme der relativen Aktivität führen.

Es wurde deshalb untersucht, in welchem Maß sich eine Probe α -Chymotrypsin auch unter ungünstigen Bedingungen selbst verdaut. Dazu wurden 51,07 mg des Enzyms bei pH 8,5 und 25°C in 50,0 cm³ 0,020 M TRIS-HCl (0,200 M an NaCl) gelöst und nach jeweils 30 Minuten die Aktivität von Proben aus dieser Lösung bestimmt. Innerhalb der ersten Stunde wurde ein leichter Anstieg der enzymatischen Aktivität um fünf Prozent verzeichnet. Darauf folgte ein kontinuierlicher Abfall der Aktivität. Nach 24 Stunden betrug der Aktivitätsverlust 16,1 Prozent. In einem weiteren Versuch unter den Reaktionsbedingungen der Immobilisierung (pH 6,0 und 0°C) konnte aber kein Rückgang der Enzymaktivität beobachtet werden. Während der sechstündigen Immobilisierungsreaktion kann daher die Eigenverdauung des α -Chymotrypsins vernachlässigt werden. Also wird der starke Rückgang der relativen Aktivität wohl dadurch verursacht, daß mit Vergrößerung der immobilisierten Enzymmenge der Substrattransport zum Harz oder der Rücktransport des Produkts der enzymatischen Spaltung die Aktivität des Immobilisats wesentlich mitbestimmt. So konnte beobachtet werden, daß die Aktivität der Immobilisate stark von der Ionenstärke der Umgebung beeinflusst wurde, während dies beim löslichen Enzym nicht der Fall war. Offensichtlich erleichtert der Elektrolyt in der Umgebung des immobilisierten Enzyms auch bei den hier beschriebenen Immobilisaten den Abtransport des ionischen Spaltproduktes aus dem Enzymsubstrat von den Harzoberfläche¹⁰⁴. Ebenfalls wurde bei Harzen mit höherer Quellbarkeit eine höhere relative Aktivität erzielt. Dies ist auf eine geringere Diffusionsbehinderung beim Substrat- und Produkttransport zurückzuführen.

3.3.1.3. Auswirkung der Reaktionstemperatur bei der Immobilisierung

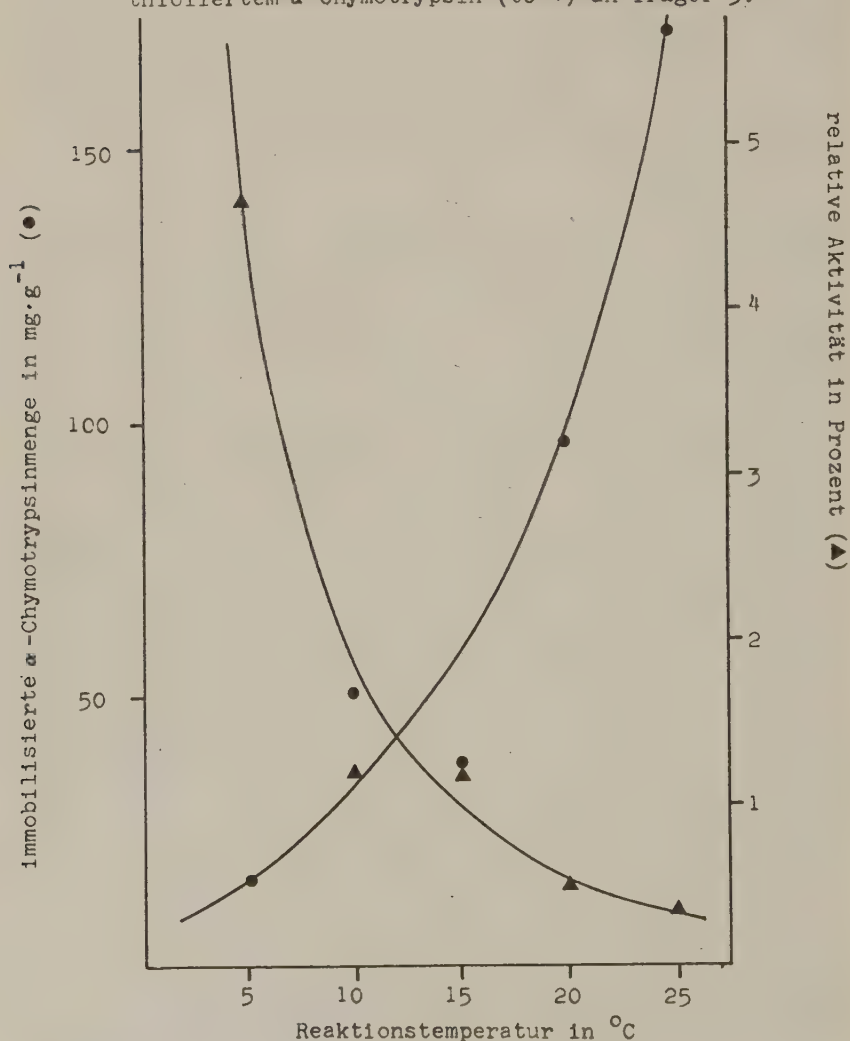
Bei den meisten Reaktionen wird mit erhöhter Temperatur eine Beschleunigung der Gleichgewichtseinstellung erhalten. Es wurde vermutet, daß dies auch bei der Immobilisierung thiolgruppen-

haltiger Enzyme an Trägern aus Poly(vinylalkohol) mit Maleinimidgruppen der Fall ist. Die Temperatur wirkt sich auf die eigentliche Additionsreaktion von Thiolgruppen an die Doppelbindung des Maleinimids, auf die Diffusion des Enzyms an die Harzpartikel, die Viskosität der Lösung und auf die Quellung der Polymeren aus. Eine erhöhte Temperatur bewirkt auch eine beschleunigte Eigenhydrolyse der Proteasen und im Extremfall ihre Denaturierung.

Es sollte daher die Abhängigkeit der Immobilisierungsreaktion von der Reaktionstemperatur untersucht werden, um die Temperatur zu finden, bei der eine maximale Aktivität des Immobilisats erreicht werden kann. Um die Auswirkung der Temperatur auf die Immobilisierungsreaktion besser untersuchen zu können, wurde die Immobilisierungsreaktion bei pH 8,0 durchgeführt, da bei diesem pH-Wert die Eigenhydrolyse des Enzyms größer ist, als bei pH 6. Als Reaktionsdauer wurden vier Stunden gewählt. Eine längere Reaktionszeit hätte vielleicht zu einer höheren gebundenen Enzymmenge geführt, war aber zur Klärung des Temperaturverlaufes nicht nötig. Die Immobilisierungsreaktionen wurden in Thermostaten durchgeführt, die genau auf die gewünschten Temperaturen eingestellt waren. Je etwa 50 mg des Trägers 3 wurden in einer Lösung von 39,52 mg thioliertem α -Chymotrypsin (tC 4) in dem schon beschriebenen Puffersystem (1.50 cm^3) suspendiert. Die Immobilisierungsreaktionen wurden nach vier Stunden durch Absaugen der Polymeren und Auswaschen des nicht gebundenen Enzyms beendet. In Abbildung 21 ist die Abhängigkeit der gebundenen Enzymmenge und die relative Aktivität der erhaltenen Immobilisate von der Temperatur dargestellt. In Abbildung 22 ist außerdem die Aktivität der erhaltenen Immobilisate in U je Gramm Immobilisat zu sehen.

Die Temperatur hatte einen unerwartet starken Einfluß auf die Immobilisierungsreaktion: Die Erhöhung der Reaktionstemperatur von 5°C auf 25°C hatte zur Folge, daß sich die immobilisierte Enzymmenge verzehnfacht hat. Die relative Aktivität fällt in diesem Intervall stark ab. Bei tiefen Temperaturen erhält man die Immobilisate mit den höchsten Aktivitäten (Abbildung 22).

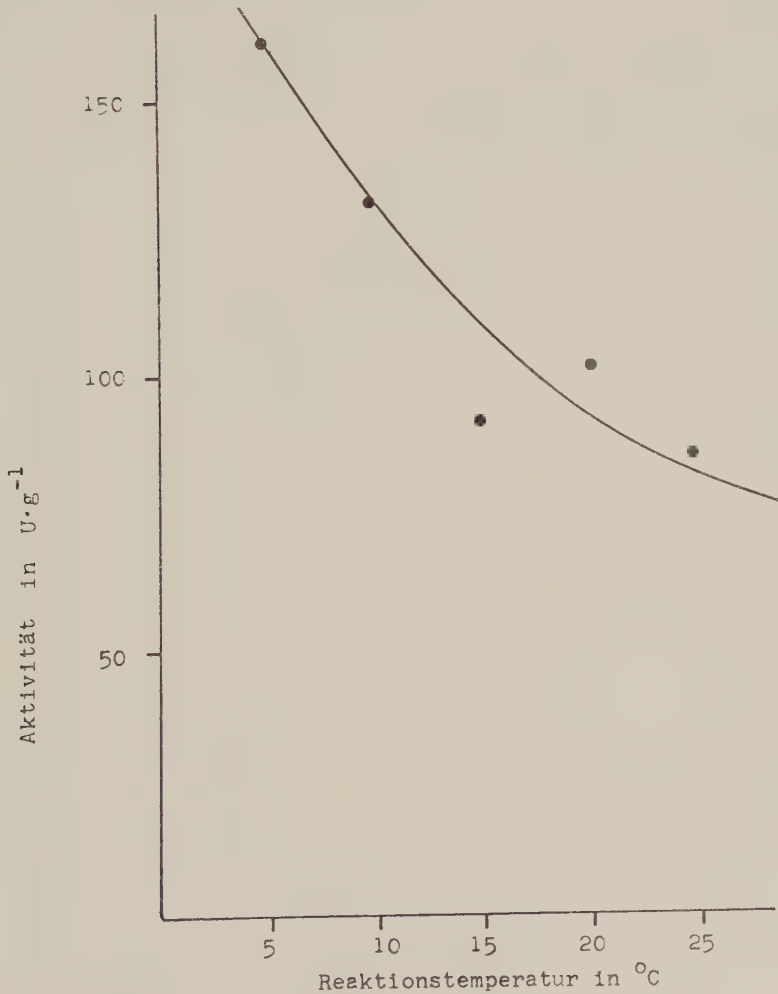
Abb.21. Auswirkung der Reaktionstemperatur auf gebundene Menge und relative Aktivität bei der Immobilisierung von thiolisiertem α -Chymotrypsin (tC 4) an Träger 3.



Bedingungen bei den Immobilisierungsreaktionen:

Je etwa 50 mg Träger 3 und 39,52 mg thiolisiertes α -Chymotrypsin (tC 4) wurden vier Stunden bei pH 8,0 in 1,50 cm³ Britton-Robinson-Puffer durchmischt. Bestimmung der gebundenen Enzymmenge nach Folin-Ciocalteu; Bestimmung der Aktivität pH-statisch bei 25°C und pH 8,5 mit 0,001 M Natronlauge.

Abb.22. Auswirkung der Temperatur bei der Immobilisierungsreaktion auf die Aktivität der erhaltenen Immobilisate



Bestimmung der Aktivitäten:

pH-statisch mit 0,020 M ATEE (0,020 M an TRIS und 0,200 M an NaCl) als Substrat bei 25°C und pH 8,5 mit 0,10 M Natronlauge.

Die gefundenen Resultate gelten aber nur für das System Poly-(vinylalkohol) und α -Chymotrypsin. Andere Enzyme (zum Beispiel Katalase) und andere Träger (zum Beispiel die Träger aus Acrylnitril) müssen dieses Verhalten nicht zeigen. Es kann also bei anderen Gelegenheiten durchaus sinnvoll sein, bei erhöhter Temperatur zu immobilisieren und dabei sowohl hohe gebundene Enzymmengen zu finden als auch hohe Aktivitäten der Immobilisate.

3.3.1.4. Einfluß des pH-Wertes auf die Immobilisierungsreaktion

Die Konzentration der Wasserstoffionen bei der Immobilisierungsreaktion kann durch Verwendung von verschiedenen Puffern eingestellt werden. Durch den Puffer wird aber automatisch die Ionenstärke in der Lösung erhöht. Soll der pH-Wert in weiten Bereichen einstellbar sein, so wird entweder für jeden pH-Wert ein anderer Puffer gebraucht, oder es muß ein kompliziertes Puffergemisch eingesetzt werden, das den ganzen gewünschten Bereich überstreicht. Dabei ist von Vorteil, daß sich die stoffliche Zusammensetzung des Puffergemisches über den gesamten pH-Bereich nicht ändert. Nachteilig ist die mäßige Kapazität eines solchen Puffers und seine nötige hohe Ionenstärke. Da die thiolierten Proteine bei kleinen pH-Werten und hohen Ionenstärken nicht gut löslich waren, mußte für die Konzentration des Puffers ein Kompromiß zwischen Ionenstärke und Kapazität gefunden werden. Es wurde ein Puffersystem aus Borsäure, Essigsäure und Phosphorsäure nach Britton und Robinson gewählt, dessen pH durch NaOH-Zugabe zwischen pH 4 und pH 12 eingestellt werden konnte¹⁰². Die angegebene Pufferkonzentration wurde für die hier beschriebenen Immobilisierungsreaktionen versiebenfacht. Es wurde also zunächst aus einer 0,40 M Lösung der drei Säuren und einer 2,00 M Natronlauge der Puffer des gewünschten pH-Wertes erzeugt und davon jeweils 2,50 cm³ zu 1,35 cm³ einer Lösung von 386,78 mg des thiolierten α -Chymotrypsins (tc 8) in 10,0 cm³ Wasser gegeben.

Wie bei der Erhöhung der Reaktionstemperatur wurden auch für eine Steigerung des pH-Wertes bei der Immobilisierungsreaktion gegensätzliche Wirkungen erwartet: Hohe pH-Werte erhöhen die Additionsgeschwindigkeit der Thiolgruppen des Enzyms an die

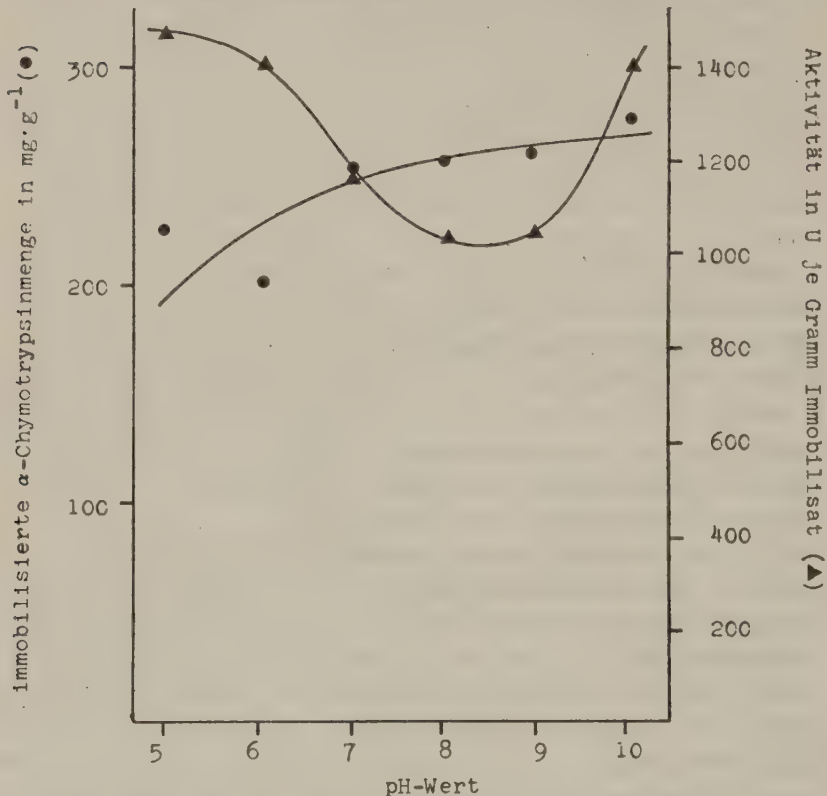
Maleinimidgruppen. Sie können sogar dazu führen, daß zusätzlich Aminogruppen addiert werden¹⁶. Gleichzeitig beginnt bei hohen CH^- -Konzentrationen die Hydrolyse der Maleinimidringe⁵⁻⁷. Die Dabei gebildeten Maleinsäureamide reagieren nicht mehr mit den Thiolgruppen, sind also für die Immobilisierungsreaktion verloren. Hat der Träger bereits mit Thiolgruppen reagiert, so färbt er sich bei hohen pH-Werten reversibel intensiv rot³. Der pH-Wert ändert aber nicht nur die Eigenschaften des polymeren Trägers, er wirkt sich auch auf das Enzym aus, denn bei hohen pH-Werten ist die Stabilität der Proteasen in wässrigen Lösungen gering. So hat α -Chymotrypsin bei pH 8,5 sein Aktivitätsmaximum und somit bei diesem pH-Wert die höchste Selbstverdauungsrate. Eine Immobilisierung bei diesem pH-Wert sollte zu Produkten mit niedriger Aktivität führen. Das Ergebnis der Immobilisierung bei verschiedenen pH-Werten ist in Abbildung 23 dargestellt. Hier wurde der Träger 1 wegen seiner hohen Quellbarkeit eingesetzt. (s. auch Tabelle 3).

Es ist zu erkennen, daß die immobilisierte Enzymmenge mit steigendem pH-Wert stetig zugenommen hat. Das bedeutet, daß bis pH 10 entweder keine Hydrolyse der Maleinimidgruppen am Polymeren erfolgt ist, oder daß sich die Abnahme der Maleinimidgruppen noch nicht bemerkbar macht. Die Aktivitäten der erhaltenen Immobilisate zeigten besonders geringe Werte, wenn in der Nähe von pH 8,5 immobilisiert worden war. Dies ist dadurch zu erklären, daß das α -Chymotrypsin in diesem pH-Bereich das Maximum seiner Aktivität besitzt. Deshalb werden hier besonders viele inaktive Bruchstücke an dem reaktiven Träger gebunden und schon immobilisiertes Enzym von noch gelöstem besonders stark angegriffen. Bei der Immobilisierung ist also der pH-Bereich in der Nähe der maximalen Aktivität wenn möglich zu meiden.

3.3.1.5. Immobilisierung bei verschiedenen Enzymkonzentrationen

Bei den bisher beschriebenen Immobilisierungsreaktionen wurden vom reaktiven Träger höchstens 300 mg Enzym je Gramm Träger gebunden. Der Träger 3 konnte sogar nur etwa 150 mg je Gramm immobilisieren. Da bei allen Untersuchungen bisher immer etwa 50 mg des Trägers eingesetzt wurden, wurden also von dieser

Abb.23. pH-Abhängigkeit der Immobilisierungsreaktion von thiolisiertem α -Chymotrypsin (tC 8) an Träger 1.



Bedingungen bei den Immobilisierungsreaktionen:

Je etwa 50 mg Träger 1 und 52,22 mg thiolisiertes α -Chymotrypsin (tC 8) in 3,85 cm³ Britton-Robinson-Puffer wurden vier Stunden bei 40°C durchmischt. Die gebundenen Enzymmengen wurden nach Folin-Ciocalteu bestimmt. Aktivitätsmessung pH-statisch bei 25°C und pH 8,5 mit ATEE als Substrat und 0,10 M Natronlauge.

Harzmenge nur 7,5 mg Enzym immobilisiert. Die angebotene Enzymmenge ist aber wesentlich größer, so daß sich auf die Immobilisierungsreaktion hier nicht die Enzymmenge, sondern die Enzymkonzentration auswirkt.

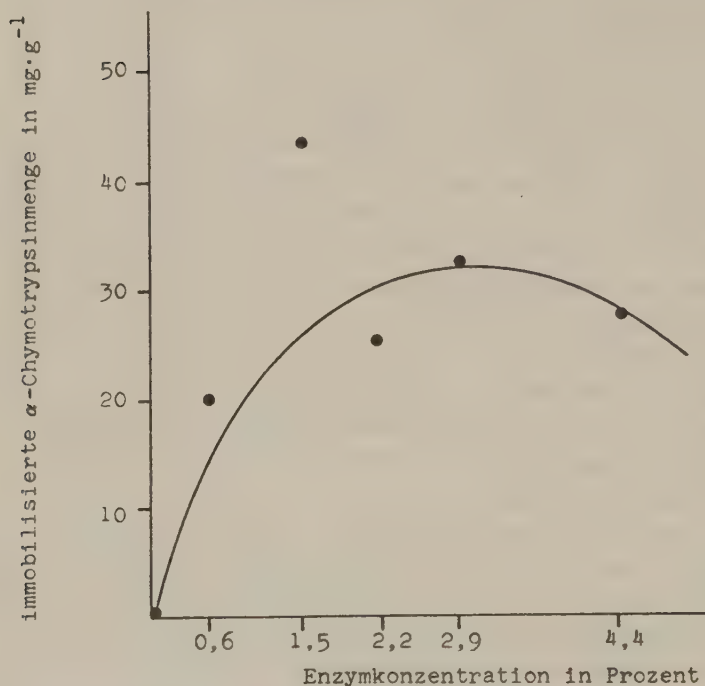
Es wurde erwartet, daß sich bei höherer Enzymkonzentration auch größere Enzymmengen immobilisieren lassen. Wegen der be-

grenzten Wanderungsgeschwindigkeit von Substrat und Produkt und wegen sterischer Effekte wurde vermutet, daß die höhere Menge von immobilisiertem Enzym zu einer Verminderung der relativen Aktivität führen würde und daß es deshalb eine Enzymkonzentration gibt, bei der eine optimale Aktivität des Immobilisats erreicht wird.

Thioliertes α -Chymotrypsin (tC 3) sollte an Träger 3 innerhalb von vier Stunden immobilisiert werden. Damit sich das Enzym bei den hier notwendigen hohen Konzentrationen in Puffer löste, wurde bei 22°C und pH 8,0 immobilisiert. Als Puffer wurde wieder ein Gemisch nach Britton-Robinson verwendet. Die verschiedenen Enzymkonzentrationen wurden eingestellt, indem zu 1,00 cm³ einer Lösung von 262,81 mg thioliertem α -Chymotrypsin in 6,00 cm³ Puffer 2,00 cm³, 1,00 cm³ oder 0,50 cm³ Puffer gegeben wurde, oder die Enzymlösung unverdünnt verwendet wurde. Die Enzymmenge in jedem Reaktionsansatz betrug also 43,80 mg. Das Ergebnis dieser Immobilisierungsreaktionen ist in Abbildung 24 gezeigt.

Der für die Enzymkonzentration von 1,50 Prozent gemessene Wert wurde zunächst als Meßfehler gedeutet. Die restlichen Werte ergaben einen schwach ansteigenden Verlauf der immobilisierten Enzymmenge mit steigender bei der Untersuchung verwendeter Konzentration an Enzym. Wegen des abweichenden Meßwertes bei der Immobilisierung aus der 1,50-prozentigen Enzymlösung in Abbildung 24 und wegen der geringen immobilisierten Enzymmenge wurde nochmals die Immobilisierungsreaktion bei verschiedenen Enzymkonzentrationen untersucht und jetzt eine Temperatur von 0°C bei pH 6,0 eingestellt. Wegen der schon erwähnten geringen Löslichkeit des thiolierten α -Chymotrypsins bei diesen Reaktionsbedingungen wurde die verwendete Enzymlösung (tC 24) nicht erst gefriergetrocknet, sondern nach Thiolierung und Gelfiltration durch Ultrafiltration bei 0°C eingeeengt und dann direkt in der Immobilisierungsreaktion eingesetzt. In Abbildung 25 sind die an Träger 3 immobilisierten Mengen bei verschiedenen Enzymkonzentrationen grafisch dargestellt. Die pro Immobilisierungsansatz verwendete Enzymmenge betrug 52,31 mg. Sie wurde aus der optischen Dichte der Lösung des Enzyms bei

Abb.24. Auswirkung der Konzentration von thiolisiertem α -Chymotrypsin auf die an Träger 3 immobilisierte Enzymmenge bei 22°C und pH 8,0.



Bedingungen bei den Immobilisierungsreaktionen:

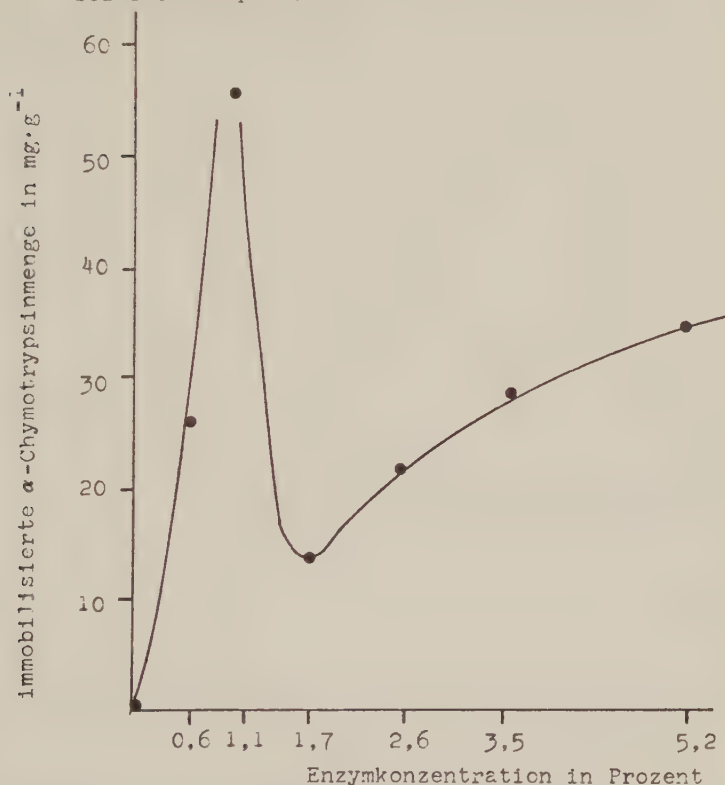
Je etwa 50 mg Träger 3 und 43,80 mg thiolisiertes α -Chymotrypsin (tC 3) in Britton-Robinson-Puffer pH 8,0 wurden vier Stunden bei 22°C durchgemischt. Die gebundenen Enzymmengen wurden nach Folin-Ciocalteu bestimmt.

278 nm berechnet.

Die Menge an immobilisiertem Enzym war bereits bei jedem untersuchten Konzentrationswert um etwa 10 mg je Gramm Träger größer, als bei der ersten Untersuchung in Abbildung 24. Wahrscheinlich ist das auf den erhöhten Thiolgruppengehalt der verwendeten Enzymcharge tC 24 zurückzuführen.

In einer weiteren Untersuchung der Konzentrationsabhängigkeit der Immobilisierungsreaktion bei 22°C und pH 6,0 konnte eine noch höhere Enzymmenge immobilisiert werden und der Verlauf der gebundenen Enzymmenge bei steigender Enzymkonzentration bestätigt werden. Auch hier war besonders viel Enzym aus

Abb.25. Auswirkung der Konzentration von thioliertem α -Chymotrypsin auf die an Träger 3 immobilisierte Enzymmenge bei 0°C und pH 6,0

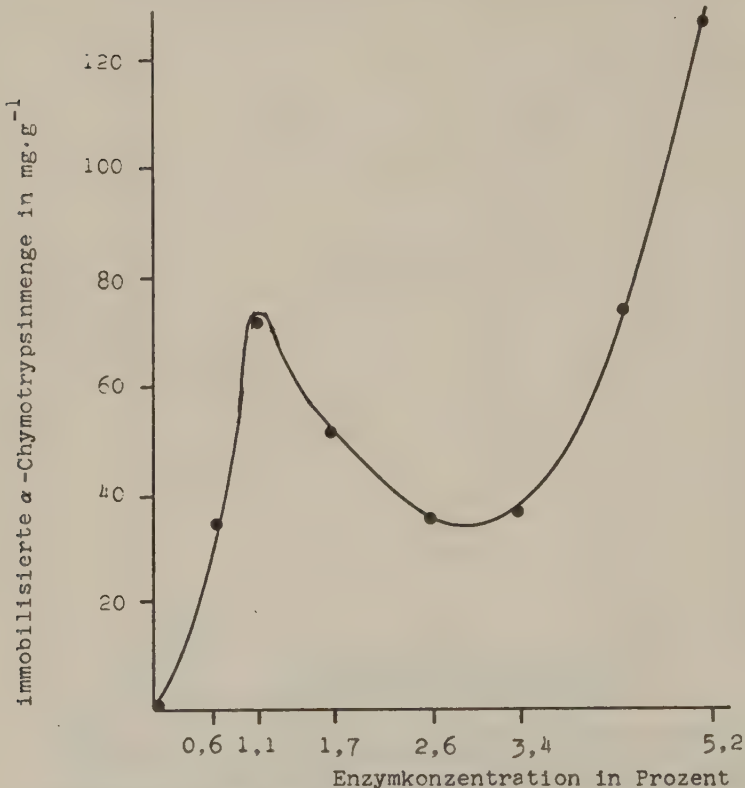


Bedingungen bei den Immobilisierungsreaktionen:

Je etwa 50 mg Träger 3 und 52,31 mg thioliertes α -Chymotrypsin (tC 24) in Britton-Robinson-Puffer pH 6,0 wurden vier Stunden bei 0°C durchmischt. Die gebundenen Enzymmengen wurden nach Folin-Ciocalteu bestimmt.

der 1,1-prozentigen Lösung immobilisiert worden (Abbildung 26). Die bisher durchgeführten Untersuchungen haben ergeben, daß an die Träger 1 und 3 die größte Menge an thioliertem α -Chymotrypsin aus einer 1,1- bis 1,5-prozentigen Lösung des Enzyms immobilisiert wurde und dies unabhängig von der Charge des thiolierten Enzyms und unabhängig von der Temperatur, bei der die Immobilisierungsreaktion durchgeführt wurde. Wegen des steilen Anstiegs der an die Träger immobilisierten Enzym-

Abb.26. Abhängigkeit der immobilisierten Menge an thiolisiertem α -Chymotrypsin (tC 25) von der eingesetzten Konzentration des Enzyms bei pH 6.0 und 22°C.

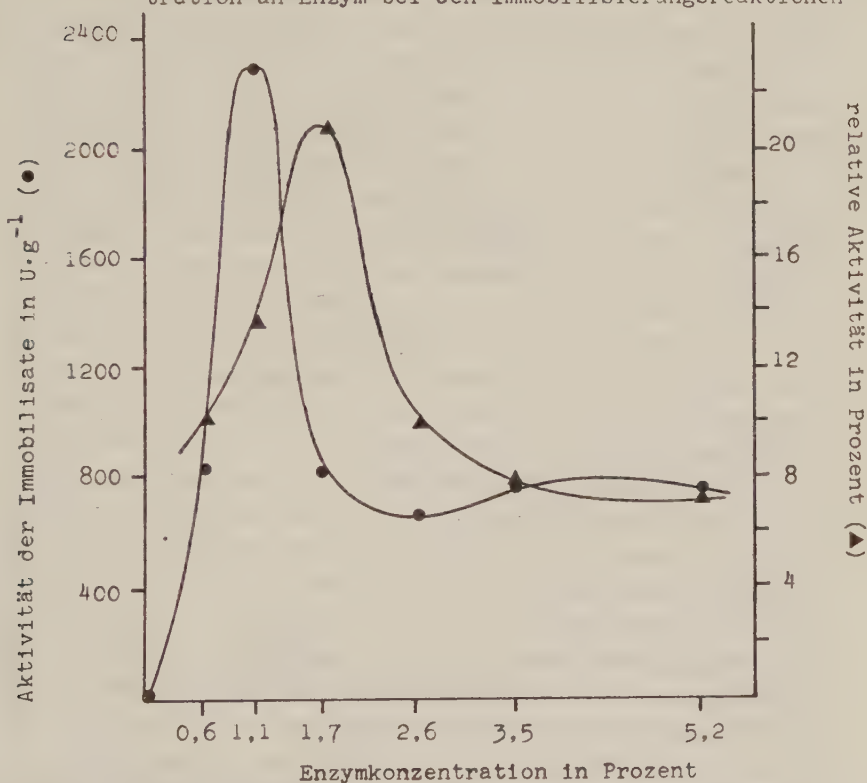


Bedingungen bei den Immobilisierungsreaktionen:

Je etwa 50 mg Träger 3 und 51,7 mg thiolisiertes α -Chymotrypsin (tC 25) in Britton-Robinson-Puffer pH 6,0 wurden vier Stunden bei 22°C durchmischt. Die gebundenen Enzymmengen wurden nach Folin-Ciocalteu bestimmt.

menge bei einer Steigerung der Enzymkonzentration von 0 auf 1,1 Prozent stieg auch die Aktivität der erhaltenen Immobilisate in diesem Bereich stark an. In Abbildung 27 sind die Aktivität und die relative Aktivität von Immobilisaten aufgeführt, die durch Immobilisierung bei verschiedenen Enzymkonzentrationen hergestellt wurden (nach Abbildung 24). Die Aktivität war am größten bei dem Immobilisat, das die größte Enzymmenge enthielt. Sie betrug hier 2298 U je Gramm Immo-

Abb.27. Abhängigkeit der Aktivität und der relativen Aktivität der Immobilisate aus Abbildung 24 von der Konzentration an Enzym bei den Immobilisierungsreaktionen



Bedingungen bei den Immobilisierungsreaktionen:

s. Abbildung 24

Messung der Aktivitäten:

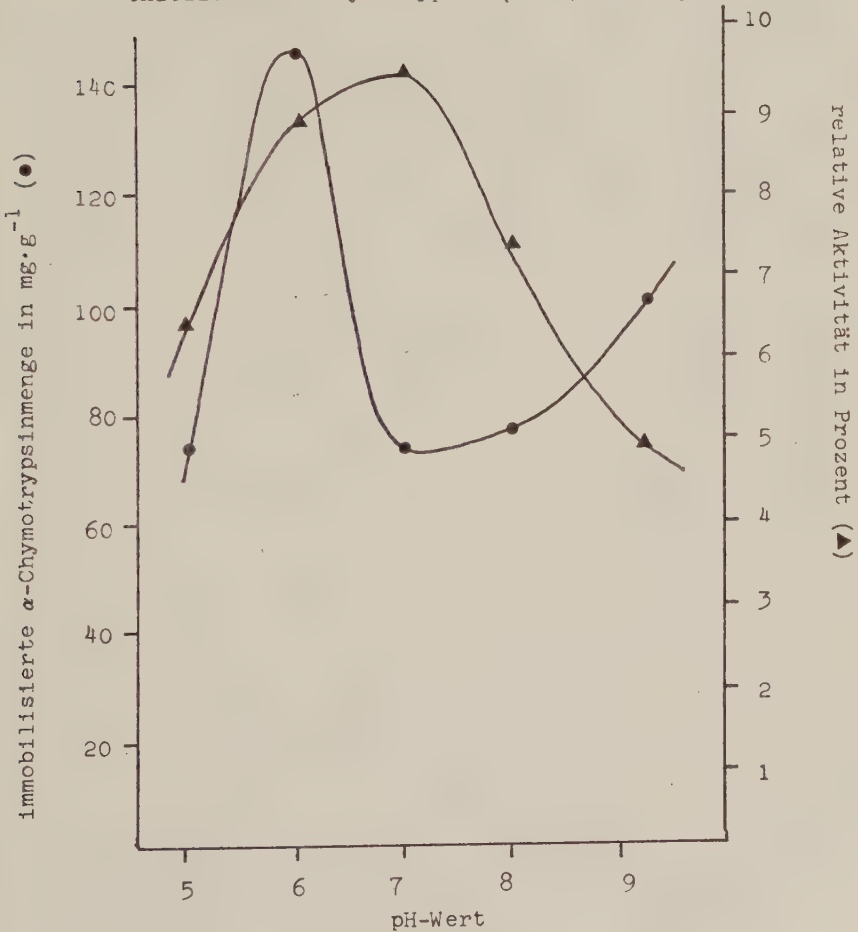
pH-statisch bei pH 8,5 und 25°C in 0,020 M ATEE-Lösung (0,020 M an TRIS·HCl, 0,200 M an NaCl) mit 0,10 M Natronlauge.

lisat. Die relative Aktivität erreicht ihren Maximalwert erst bei der Immobilisierung aus einer 1,7-prozentigen Enzymlösung. Hier ist die immobilisierte Enzymmenge gering. Die bei höheren Enzymkonzentrationen hergestellten Immobilisate zeigten keine Zunahme der Aktivität sowie der relativen Aktivität auf, wenn bei 0°C immobilisiert worden war.

Die in diesem Kapitel gefundenen Effekte lassen sich durch die Bildung von Aggregaten der α -Chymotrypsinmoleküle erklären, die entstehen, wenn eine bestimmte Enzymkonzentration überschritten wird¹⁰³. Es muß angenommen werden, daß die großen Aggregate in geringerem Ausmaß immobilisiert werden, als kleine Moleküle. Bei der Erhöhung der Enzymkonzentration in der Reaktionslösung wird dann zunächst auch die Konzentration des Enzyms am Träger erhöht. Dadurch kommt es zu einer größeren Immobilisierungsgeschwindigkeit. Bei weiterer Erhöhung der Enzymkonzentration erfolgt dann der Zusammenschluß von einzelnen Enzymmolekülen zu Aggregaten. Dadurch sinkt die Menge an einzelnen Enzymmolekülen und die Immobilisierungsgeschwindigkeit nimmt ab. Bei der Konzentration, bei der sich die meisten Enzymmoleküle zu Aggregaten zusammengeschlossen haben, wird auch die geringste Menge des Enzyms an dem Träger gebunden. Steigert man die Enzymkonzentration weiter, so nimmt auch die Konzentration der Aggregate zu und es wird wieder mehr Enzym immobilisiert. Diese Zunahme erfolgt aber langsamer, weil zum einen jetzt größere Partikel an dem Träger gebunden werden müssen und zum anderen die Konzentration an Aggregaten mit wachsender Enzymmenge nur noch langsam zunimmt. Der Zusammenschluß der α -Chymotrypsinmoleküle zu größeren Aggregaten sollte aber nicht nur von der Konzentration des Enzyms, sondern auch vom pH-Wert und von der Temperatur beeinflusst werden. Durch die pH-abhängige Bildung solcher Aggregate wird der in Abbildung 28 dargestellte Zusammenhang von immobilisierter Enzymmenge mit dem pH-Wert erklärbar: Wegen der Bildung von aggregierten Enzymmolekülen bei pH-Werten um pH 7,5 (isoelektrischer pH-Wert des α -Chymotrypsins ist pH 8,0) ist bei diesem Wert die an Träger 3 immobilisierte Enzymmenge besonders gering und die relative Aktivität besonders hoch. Wegen der hohen Enzymmenge, die bei pH 6,0 immobilisiert werden konnte, wird die höchste Aktivität auch bei den Immobilisaten erreicht, die bei diesem pH-Wert entstanden sind (Abbildung 29).

Die Ergebnisse aus der Untersuchung der Abhängigkeit der Immobilisierungsreaktion von der α -Chymotrypsinkonzentration

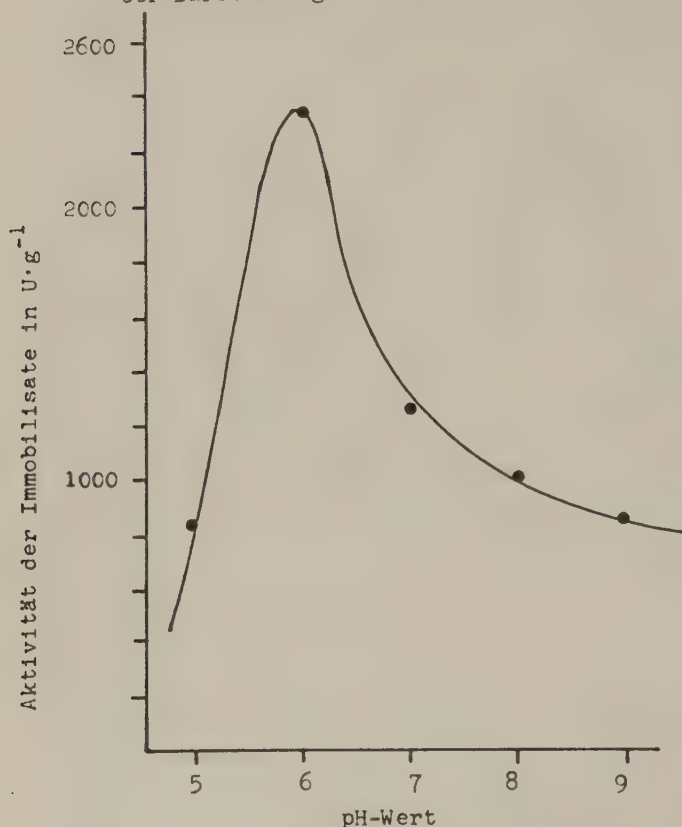
Abb.28. Abhängigkeit der gebundenen Enzymmenge und der relativen Aktivität vom pH-Wert bei der Immobilisierung von thiolisiertem α -Chymotrypsin (tc 8) am Träger 3



Bedingungen bei den Immobilisierungsreaktionen:

Je etwa 50 mg Träger 3 und 40,18 mg thiolisiertes α -Chymotrypsin (tc 8) in $3,00 \text{ cm}^3$ Britton-Robinson-Puffer wurden vier Stunden bei 4°C durchmischt. Die gebundenen Enzymmengen wurden nach Folin-Ciocalteu bestimmt, die Aktivitätswerte durch pH-statische Titration bei 25°C und pH 8,5 in 0,020 M ATEE (0,020 M an TRIS-HCl und 0,200 M an NaCl) mit 0,10 M NaOH.

Abb.29. Abhängigkeit der Aktivität der Immobilisate aus thio-
liertem α -Chymotrypsin und Träger 3 vom pH-Wert bei
der Darstellung.



Messung der Aktivitäten:

pH-statisch bei pH 8.5 und 25°C in 0.020 M ATEE-Lösung
(0.020 M an TRIS-HCl und 0.200 M an NaCl) mit 0.100 M
Natronlauge.

zeigen, daß ein gutes Immobilisat mit hoher Aktivität und hoher trägergebundener Enzymmenge nur erreicht werden kann, wenn bei Bedingungen immobilisiert wurde, unter denen keine Aggregation der Enzymmoleküle stattfindet.

3.3.1.6. Wirkung von Harnstoff bei der Immobilisierung

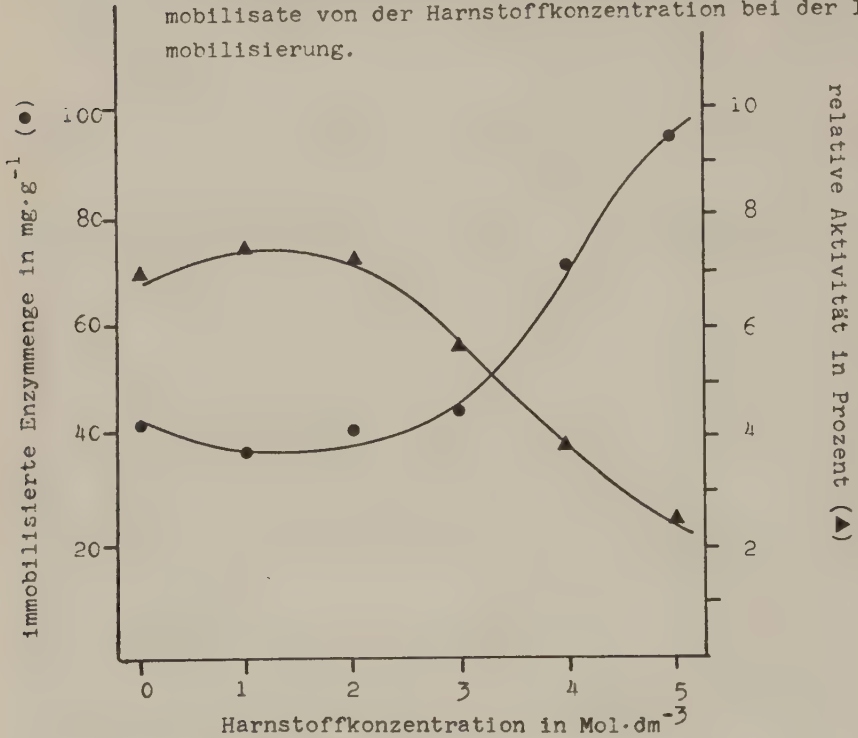
Durch die Verminderung von hydrophoben Wechselwirkungen können Enzymmoleküle aufgeweitet werden. Dadurch wird eine reversible Denaturierung erreicht, die von vorübergehendem Aktivi-

tätsverlust begleitet wird^{84,104}. Von den verschiedenen Reagenzien, die denaturierend wirken, wurde für diese Untersuchungen Harnstoff ausgesucht¹⁰⁵⁻¹⁰⁹, weil durch Harnstoff die Proteinbestimmung nicht gestört wird und Harnstoff den pH-Wert der Pufferlösungen nicht verändert. Von einer Aufweitung der Enzymstruktur wurde erwartet, daß mehr Enzym vom Träger immobilisiert wird, weil reaktive Gruppen des Enzyms jetzt leichter an die Maleinimidgruppen des reaktiven Trägers gelangen können. Da die Denaturierung des Enzyms reversibel ist, wurde erwartet, daß die enzymatische Aktivität der Immobilisate nach dem Auswaschen des Harnstoffs zurückkehrt.

Zur praktischen Durchführung der Untersuchung wurden 1,30 cm³ eines Britton-Robinson-Puffers vom pH 6,0 mit 1,30 cm³ einer 3,7-prozentigen Lösung von thioliertem α -Chymotrypsin (tc 9) gemischt. Die Pufferlösungen waren 10 M, 8 M, 6 M, 4 M und 2 M an Harnstoff. Das Ergebnis der Immobilisierungsreaktionen bei 4°C ist in Abbildung 30 dargestellt. In Abbildung 31 sind außerdem die Aktivitätswerte der erhaltenen Immobilisate aufgeführt.

Aus Abbildung 30 ist zu erkennen, daß sich der Harnstoff erst oberhalb einer Konzentration von 3 M auf die immobilisierte Enzymmenge auswirkte. Oberhalb dieser Konzentration stieg die immobilisierte Enzymmenge mit steigender Harnstoffkonzentration linear weiter an. Die relative Aktivität begann aber schon bei Harnstoffkonzentrationen um 2 M abzusinken. Bei der Immobilisierungsreaktion in 5 M Harnstofflösung betrug sie nur noch etwa ein Drittel ihres Anfangswerts. Mit dem Absinken der relativen Aktivität war ein starker Rückgang der Aktivitäten der erhaltenen Immobilisate bei höheren Harnstoffkonzentrationen verbunden: Von ursprünglich 715 U je Gramm Immobilisat fiel die Aktivität und erreichte nach der Immobilisierung in 5 M Harnstofflösung nur noch 530 U·g⁻¹. Der starke Rückgang der relativen Aktivität kann dadurch erklärt werden, daß die Aufweitung des Enzymmoleküls nach der Immobilisierungsreaktion nicht mehr reversibel ist. Diese Beobachtung spricht für eine mehrfache Bindung eines Enzymmoleküls an den reaktiven Träger. Für die Immobilisierung ist also die Anwesenheit von Harnstoff nachteilig, weil dadurch die Aktivität der erhaltenen Immobilisate vermindert wird.

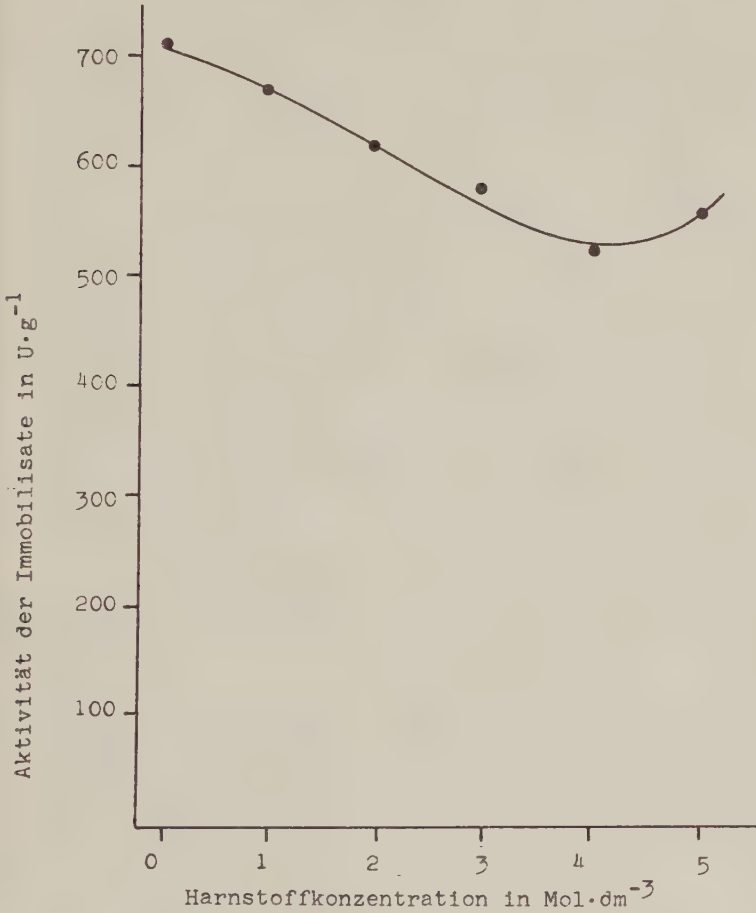
Abb.30. Abhängigkeit der immobilisierten Menge von thiolier-tem α -Chymotrypsin und der relativen Aktivität der Immobilisate von der Harnstoffkonzentration bei der Immobilisierung.



Bedingungen bei den Immobilisierungsreaktionen:

Je etwa 50 mg Träger 3 und 48,08 mg thioliertes α -Chymotrypsin (tC 9) in 2,60 cm³ Britton-Robinson-Puffer pH 6.0 mit verschieden hohen Harnstoffkonzentrationen wurden vier Stunden bei 4°C durchmischt. Die gebundene Enzymmenge wurde nach Folin-Ciocalteu bestimmt, die Aktivitätswert durch pH-statische Titration bei 25°C und pH 8,5 in 0,020 M ATEE-Lösung (0,020 M an TRIS-HCl und 0,200 M an NaCl) mit 0.10 M Natronlauge.

Abb. 31. Abhängigkeit der Aktivität der aus thioliertem α -Chymotrypsin (tC 9) und Träger 3 dargestellten Immobilisate von der Harnstoffkonzentration bei ihrer Darstellung



Messung der Aktivitäten:

pH-statisch bei pH 8,5 und 25°C in 0,020 M ATEE-Lösung (0,020 M an TRIS·HCl und 0,200 M an NaCl) mit 0,10 M Natronlauge.

3.3.1.7. Auswirkung der Anzahl der Thiolgruppen des thiolierten α -Chymotrypsins auf die Immobilisierungsreaktion

Die Aufweitung des Enzymmoleküls durch Harnstoff führte zu einer Erhöhung der Menge des immobilisierten Enzyms. Der dabei auftretende irreversible Aktivitätsverlust spricht für eine mehrfache Bindung des Proteins ans Harz. Wenn mit der Anzahl der möglichen kovalenten Bindungen je Enzymmolekül die Bindungswahrscheinlichkeit zunimmt, sollte eine Erhöhung der Anzahl der SH-Gruppen am Protein zu einer Erhöhung der Menge des immobilisierten Enzyms führen. Da die thiolierten Chargen des α -Chymotrypsins untereinander auch Unterschiede in ihrem SH-Gehalt aufweisen, standen Enzymmoleküle mit verschiedener Anzahl an Thiolgruppen zur Verfügung. Obwohl wegen anderer ebenfalls unterschiedlicher Eigenschaften wie Löslichkeit, Einheitlichkeit oder geändertem isoelektrischen pH ein vollkommener Vergleich zwischen den Enzymchargen nicht möglich ist, kann doch nach einem Zusammenhang zwischen SH-Gehalt und gebundener Eiweißmenge gesucht werden. In Tabelle 22 ist die Auswirkung des SH-Gehaltes des thiolierten α -Chymotrypsins auf die Menge des an Träger 3 immobilisierten Enzyms sowie auf die Aktivität und die relative Aktivität aufgeführt.

Tab. 22. Auswirkung des SH-Gehaltes von thioliertem α -Chymotrypsin auf Aktivität, relative Aktivität und immobilisierte Menge

Thiolgruppengehalt gebundene Enzym- ($\text{Mol}_{\text{SH}} \cdot \text{Mol}_{\text{Enzym}}^{-1}$)	menge ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)	Aktivität ($\text{U} \cdot \text{g}^{-1}$)	relative Aktivität (Prozent)
0,0	3,3	102	10,3
1,0	34,5	194	6,2
1,0	43,1	606	5,5
2,2	47,2	628	6,2
4,1	82,8	702	4,8
4,3	79,3	536	5,6
4,4	145,3	2345	8,9
5,1	160,7	2690	6,5

Bedingungen bei den Immobilisierungsreaktionen:

Je etwa 50 mg Träger 3 und etwa 55 mg thioliertes α -Chymotrypsin wurden vier Stunden bei 4°C und pH 6,0 durchgemischt. Die gebundenen Enzymmengen wurden nach Folin-Ciocalteu bestimmt. Aktivitätsmessung mit ATEE als Substrat bei 25°C und pH 8,50.

Aus der Tabelle ist zu erkennen, daß die relative Aktivität der Immobilisate von der Anzahl der SH-Gruppen am Enzymmolekül beeinflusst wird. Die Werte für die gebundene Eiweißmenge lassen die Tendenz erkennen, daß mit steigendem SH-Gehalt der Enzymmoleküle auch die immobilisierte Enzymmenge ansteigt. Als Resultat zeigen die Harze mit hoher gebundener Enzymmenge hier auch hohe Aktivitäten. Eine große Menge an SH-Gruppen am Enzym ist also Voraussetzung für ein gutes Immobilisierungsergebnis.

3.3.1.8. Immobilisierung verschiedener thiolgruppenhaltiger Enzyme

Während α -Chymotrypsin in reiner, definierter Form in großen Mengen preiswert erhältlich ist, gilt dies für die meisten Enzyme nicht. Zur Klärung des Verlaufs der Immobilisierungsreaktion ist α -Chymotrypsin also das Enzym der Wahl. Ein guter Träger muß aber auch in der Lage sein, andere Enzyme zu binden. Vom modifizierten Poly(vinylalkohol) werden zwei Eigenschaften erwartet: Die gebundene Eiweißmenge wird bei sonst gleichen Reaktionsbedingungen mit steigender Größe des Enzymmoleküls abnehmen und die relative Aktivität wird besonders dann hoch sein, wenn kleine Substratmoleküle von Enzymen mit geringer Geschwindigkeit umgesetzt werden, da sowohl die Diffusion des Substrates oder Produktes zum oder vom Enzym eine Rolle spielt, als auch die Erreichbarkeit des Enzymmoleküls: Ist das Enzym in der Nähe seines aktiven Zentrums am Harz gebunden, können große Substratmoleküle das Enzym nicht mehr in der nötigen Position treffen, das Enzymmolekül ist also inaktiv geworden. Deshalb werden gravierende Unterschiede in der enzymatischen Aktivität zwischen den fast gleich großen Enzymmolekülen Ribonuclease und Lysozym vor und nach der Immobilisierungsreaktion erwartet: Während RNase als Substrat das Salz des Cytidin-2',3'-cyclophosphats angeboten wurde, mußte Lysozym die β -1,4-glycosidischen Bindungen in den Zellwänden von *M. Lysodeicticus* spalten. Die Größe der Bakterien bedingt, daß nur Enzymmoleküle, die außen am Polymeren gebunden sind, mit dem Substrat reagieren können. Außerdem muß das Enzym so gebunden sein, daß der in der Enzymstruktur vorhandene Spalt das Substrat aufnehmen kann. Es wurde daher erwartet, daß Lysozym nur noch eine geringe relative

Aktivität nach der Immobilisierung aufweist. Stärker als derartige sterische Effekte wirkte sich auf die relative Aktivität aber die Geschwindigkeit der Enzyme bei der Substratspaltung aus (Tabelle 23). "Langsamere" Enzyme, wie RNase oder Trypsin zeigten nach ihrer Immobilisierung immer höhere relative Aktivitäten, als "schnelle" Enzyme wie Lysozym oder Katalase, die nach der Immobilisierung oft weniger als ein Prozent ihrer ursprünglichen Aktivität aufwiesen.

Tab. 23. Immobilisierte Enzymmenge, Aktivität und relative Aktivität von Immobilisaten aus verschiedenen Enzymen

Enzymcharge	gebundene Enzymmenge (mg·g ⁻¹)	Aktivitätswerte		relative Aktivität (Prozent)
		des Immobilisats (U·g ⁻¹)	des Enzyms (U·mg ⁻¹)	
α -Chymotrypsin	3,3	102	330	10,3
thiol. α -Chymotryps. (tC 23)	36,0	706	175	11,2
thiol.Trypsin (tT 14)	77,8	398	23	22,7
thiol.RNase (tR 1)	86,9	74	17	5,0
thiol.Lysozym (tL 5)	30,1	4594	66200	0,5
Katalase	15,0	5160	56000	0,6

Bedingungen bei den Immobilisierungsreaktionen:

Je etwa 50 mg Träger 3 und 1,30 cm³ der 1,5-prozentigen Enzymlösung in Britton-Robinson-Puffer pH 6,0 (8,0 bei Katalase) wurden vier Stunden bei 22°C durchgemischt. Die gebundenen Enzymmengen wurden nach Folin-Ciocalteu bestimmt.

Die in Tabelle 23 aufgeführten Immobilisate wurden aus 1,5-prozentigen Enzymlösungen in Britton-Robinson-Puffer pH 6,0 bei 22°C mit Träger 3 in vierstündiger Immobilisierungsreaktion dargestellt. Die Immobilisate aus Katalase erforderten eine Sonderbehandlung, da Katalase bei Gefriertrocknen einen Teil ihrer Aktivität verliert. Außerdem mußte hier bei pH 8,0 immobilisiert werden, um die Kristallsuspension des Enzyms lösen zu können. Bei den Immobilisaten aus Katalase wurde also erst die

Aktivität einer Probe bestimmt, diese gefriergetrocknet und danach ihr Gewicht ermittelt.

Die Menge an gebundenem Protein ist, wie bereits erwähnt, von derart vielen Faktoren abhängig, daß bei der Verwendung von verschiedenartigen Enzymen kein stetiger Zusammenhang mit der Molekülgröße erkennbar ist. Immerhin wurde aber von der Katalase, die unter den hier aufgeführten Enzymen das höchste Molekulargewicht hat, mit $15,0 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ am wenigsten gebunden. Wie erwartet, führte eine hohe Enzymaktivität zu geringen relativen Aktivitäten nach der Immobilisierung. Beim Vergleich der relativen Aktivitäten von immobilisierter Katalase mit der des immobilisierten Lysozyms war allerdings kein Unterschied erkennbar, der dem größeren Substrat des Lysozyms zuzusprechen wäre.

3.3.1.9. Vergleich der Träger 1, 2 und 3 untereinander

Die Eignung eines Trägers zur Immobilisierung wird von vielen Faktoren bestimmt. So sollen die Träger reaktive Gruppen tragen, die von den Enzymen leicht erreichbar sein sollen. Deshalb müssen die Träger eine große Oberfläche besitzen oder gut quellbar sein. Andererseits sollen sie mechanisch stabil sein und beim Packen in Säulen vernünftige Flußgeschwindigkeiten zulassen. Um die Auswirkungen der mechanischen Eigenschaften der Träger untersuchen zu können, wurden die reaktiven Träger mit Maleinimidgruppen sowohl aus zu 5 Molprozent vernetztem Poly(vinylalkohol) dargestellt, als auch aus einem zu zwei Molprozent und einem zu einem Molprozent vernetzten Harz. Die Fähigkeit dieser drei Träger, mit thiolgruppenhaltigen Enzymen zu reagieren, wurde untereinander verglichen. Dazu wurden Immobilisate dieser Träger mit thioliertem α -Chymotrypsin, thioliertem Trypsin, thiolierter Ribonuclease und thioliertem Lysozym dargestellt und deren Eigenschaften untersucht. (Tabelle 24).

Nur in wenigen Fällen wurden dabei große Unterschiede beobachtet. Der Träger 1 aus zu einem Molprozent vernetztem Poly(vinylalkohol) wurde wegen seiner geringen mechanischen Stabilität kaum untersucht. Bei einer vergleichenden Immobilisierung aus einer 1,4-prozentigen Lösung von thioliertem α -Chymo-

trypsin bei pH 8.0 und 4°C konnten in vier Stunden zwar an Träger 1 261,1 mg Enzym je Gramm Träger immobilisiert werden und an dem weniger gut quellbaren Träger 3 nur 76,4 mg je Gramm, das Immobilisat aus Träger 3 hatte aber die höhere Aktivität von $1054 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$; das Immobilisat aus Träger 1 wies nur $1004 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$ auf.

Tab.24. Vergleich der gebundenen Enzymmenge, der Aktivität sowie der relativen Aktivität von Immobilisaten aus den Trägern 2 und 3

Enzymcharge	Träger	gebundene Enzym- menge ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)	Aktivität ($\text{U} \cdot \text{g}^{-1}$)	relative Akti- vität (Prozent)
tC 23	2	46,0	1151	14,3
	3	36,0	706	11,2
tT 14	2	89,5	553	27,3
	3	83,3	361	18,2
tR 1	2	87,5	121	8,2
	3	86,9	74	5,0
tL 5	2	53,0	10353	0,6
	3	30,1	4594	0,5

Bedingungen bei den Immobilisierungsreaktionen:

Je etwa 50 mg der Träger und $1,30 \text{ cm}^3$ der 1,5-prozentigen Enzymlösungen in Britton-Robinson-Puffer pH 6,0 wurden vier Stunden bei 22°C durchmischt. Die gebundenen Enzymmengen wurden nach Folin-Ciocalteu bestimmt.

Der Vergleich der Träger 2 und 3 fällt zugunsten des Trägers 2 aus: Nimmt man seine etwas geringere mechanische Stabilität in Kauf, so ist er zu Immobilisierungsreaktionen besser geeignet, als Träger 3, denn er kann nicht nur höhere Enzymmengen immobilisieren, die mit ihm dargestellten Immobilisate wiesen auch eine höhere relative Aktivität auf, als die Immobilisate aus Träger 3. Dadurch war die Aktivität der Immobilisate aus Träger 2 in manchen Fällen doppelt so groß wie die aus Träger 3.

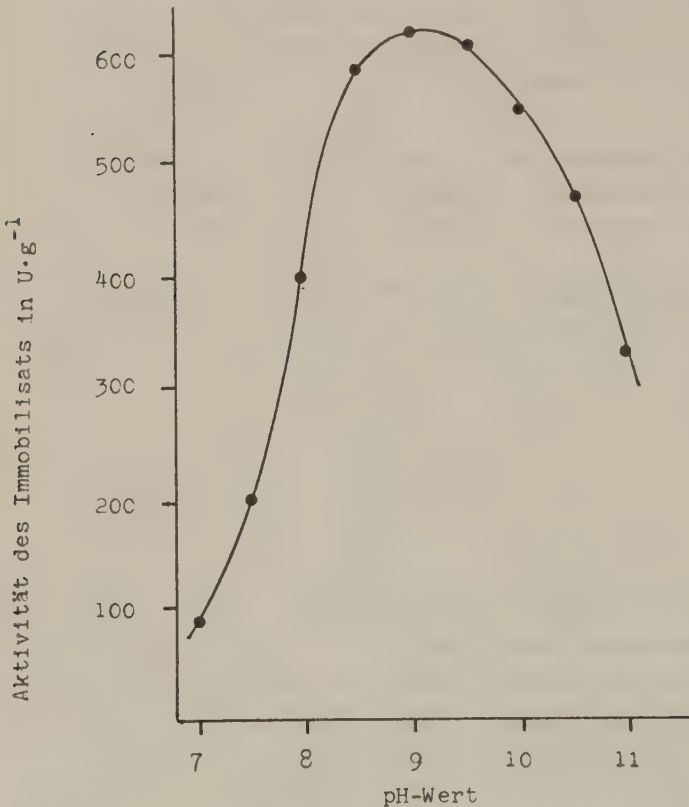
3.3.1.10. Weitere Charakterisierung der Immobilisate an Trägern aus Poly(vinylalkohol)

Die Angabe von immobilisierter Enzymmenge, Aktivität der Immobilisate und relativer Aktivität sind nötige Parameter zur Beschreibung von Immobilisaten. Sie reichen aber nicht aus, ein Immobilisat vollständig zu charakterisieren. Hierzu ist auch das pH-Profil der enzymatischen Aktivität des immobilisierten Enzyms nötig, das oft durch Diffusion oder andere Effekte gegenüber dem pH-Profil der Aktivität des löslichen Enzyms verschoben ist.

Zwei typische Beispiele für die Aktivitäten von Immobilisaten bei verschiedenen pH-Werten zeigen die beiden folgenden Abbildungen: In Abbildung 32 ist das pH-Profil von immobilisiertem α -Chymotrypsin und in Abbildung 33 das von immobilisiertem Trypsin dargestellt. Beide Kurven unterscheiden sich nicht wesentlich von denen der löslichen Enzyme (s. Abbildungen 11 und 13 sowie 18 und 19), sie sind lediglich um etwa eine halbe pH-Einheit zu höheren pH-Werten verschoben. Das Maximum der Aktivität von immobilisiertem α -Chymotrypsin liegt also jetzt bei pH 9,0. Immobilisiertes Trypsin erreicht seine volle Aktivität nach der Immobilisierung ebenfalls erst bei diesem pH-Wert. Dieses Verhalten erklärt sich dadurch, daß eines der Produkte der enzymatischen Spaltung eine Säure ist, die recht langsam von ihrer Entstehungsstelle wegdiffundiert, also den pH in der Umgebung des Enzyms senkt. Durch Erhöhung des pH-Wertes der Lösung und Erhöhen der Elektrolytkonzentration kann dieser Effekt kompensiert werden.

Die K_M -Werte von Immobilisaten und von löslichen Enzymen wurden durch doppelreziproke Auftragung der Aktivität (v^{-1}) gegen die Substratkonzentration (S^{-1}) nach Lineweaver und Burk bestimmt, indem die Enzymaktivität bei verschiedenen Substratkonzentrationen pH-statisch gemessen wurde¹¹¹. Unter den gewählten Versuchsbedingungen wurde für Trypsin ein K_M -Wert von $6,45 \cdot 10^{-5} \text{ Mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ bestimmt. Die K_M -Werte für die thiolierten Trypsinderivate lagen bei durchschnittlich $5,16 \cdot 10^{-5} \text{ Mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Unbehandeltes α -Chymotrypsin hatte unter den Versuchsbedingungen einen Wert von $K_M = 2,68 \cdot 10^{-3} \text{ Mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, die thiolierten Enzymderivate im Durchschnitt $K_M = 2,83 \cdot 10^{-3} \text{ Mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Sowohl für

Abb.32. Typisches pH-Profil der Aktivität von immobilisiertem α -Chymotrypsin.

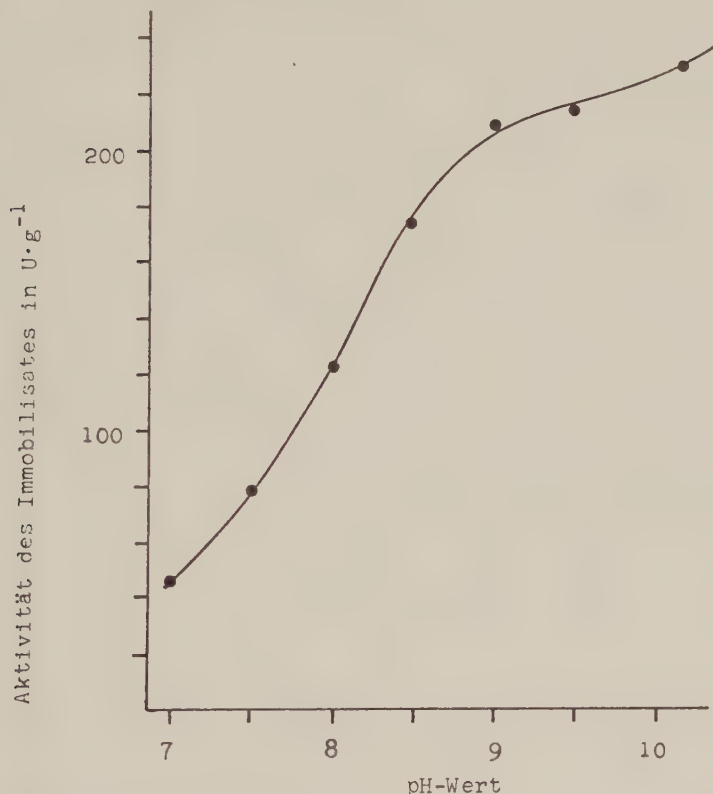


Messung der Aktivitäten:

pH-statisch mit 12,44 mg Immobilisat in 0,020 M ATEE-Lösung (0,020 M an TRIS-HCl und 0,200 M an NaCl) mit 0,10 M Natronlauge bei 25°C in 11,0 cm³ Lösung.

Trypsin als auch für α -Chymotrypsin ergaben sich nach der Immobilisierung wesentlich größere K_M -Werte (im Mittel für α -Chymotrypsin $14,2 \cdot 10^{-3}$ Mol·dm⁻³ und für Trypsin $24,7 \cdot 10^{-5}$ Mol·dm⁻³). Zum Erreichen maximaler Enzymaktivität muß demnach bei den immobilisierten Enzymen eine höhere Substratkonzentration eingesetzt werden, als bei den gelösten Enzymen. Es wurde gefunden, daß die K_M -Werte der Immobilisate eine Funktion der Aktivitäten sind: Für α -Chymotrypsin wurde zum Beispiel ein K_M -

Abb.33. Typisches pH-Profil der Aktivität von immobilisiertem Trypsin.



Messung der Aktivitäten:

pH-statistisch mit 45,37 mg Immobilisat in 0,010 M BAEE-Lösung (0,010 M an TRIS·HCl und 0,100 M an NaCl) mit 0,10 M Natronlauge bei 25°C in 21 cm³ Lösung.

Wert von $37 \cdot 10^{-3}$ Mol·dm⁻³ bei einem Immobilisat mit einer Aktivität von 2298 U·mg⁻¹ und ein K_M -Wert von $8,95 \cdot 10^{-3}$ Mol·dm⁻³ bei einer Aktivität von 551 U·g⁻¹ gefunden.

Bei allen Immobilisaten wurde eine exzellente Stabilität der Enzymaktivität gefunden. So zeigten Immobilisate aus α -Chymotrypsin nach vierjähriger Lagerung in Wasser bei 4°C keinen wesentlichen Aktivitätsverlust. Zweiwöchige Lagerung bei pH 8,5 und 25°C führte lediglich zu einem Aktivitätsverlust von 18 Prozent. Selbst nach mehrfachem Durchfahren des pH-Profiles der Aktivität

mit pH-Werten bis pH 12.5 war bei pH 9 keine Minderung der maximalen Aktivität zu beobachten. Die Immobilisate verloren ihre Aktivität auch nach rascher Entquellung in Aceton und Lagerung in diesem Lösungsmittel nicht: Nach zwei darauffolgenden Aktivitätsmessungen hatten sie ihre ursprüngliche Aktivität zurückgehalten.

Nur Immobilisate aus Katalase waren weniger stabil. Mehrmonatiges Aufbewahren in wässrigem Medium bei 4°C führte zu allmählichem Aktivitätsrückgang, so daß nach etwa dreieinhalb Jahren keine Aktivität der Immobilisate mehr vorhanden war. Gefriergetrocknete Immobilisate der Katalase hatten aber auch nach dieser Zeit noch ihre ursprünglich gemessene Aktivität behalten. Der Rückgang der Aktivität bei längerer Lagerung in wässrigem Medium wird auf Abdissoziieren der nicht kovalent gebundenen prosthetischen Gruppen der Katalase oder bakteriellen Befall der Immobilisate zurückgeführt.

3.3.2. Immobilisierung thiolgruppenhaltiger Enzyme an reaktiven Trägern auf der Basis von Poly(acrylnitril)

Die Synthese eines reaktiven, maleinimidgruppenhaltigen Poly(vinylalkohol)-Derivates ist verhältnismäßig aufwendig. Sowohl die Vernetzung, das Trocknen, Mahlen und Separieren des Polymeren wie auch die Darstellung des geeigneten Maleinimiderivates ist sehr zeitintensiv. Besonders langwierig ist die Reaktion der Maleinimidverbindung mit dem Polymeren zum fertigen Träger.

Ein guter Träger sollte schnell und preiswert herzustellen sein und höhere Ausbeuten bei der Immobilisierungsreaktion möglich machen. Von den reaktiven Trägern aus Poly(vinylalkohol) wurden oft nur etwa 50 mg Enzym von einem Gramm Träger gebunden. Wurde dies bei einer Immobilisierungsreaktion erreicht, bei der 50 mg Enzym mit 50 mg Träger umgesetzt wurden, so wurden nur fünf Prozent des angebotenen Enzyms immobilisiert. Da die relative Aktivität der meisten Immobilisate bei etwa zehn Prozent lag, war von der ursprünglich eingesetzten Enzymaktivität nur etwa ein halbes Prozent als trägergebundene Aktivität verblieben. Ein neuer reaktiver Träger sollte diesen Wert signifikant vergrößern.

Reaktive Träger waren leicht aus Poly(acrylnitril) und N-Methylolmaleinimid zugänglich (s. Abschnitt 3.1.2.2.). Im Gegensatz zum Poly(vinylalkohol) zeigten alle Träger bis auf Träger 7 Schwammstruktur. Die Träger 5, Träger 6 und Träger 7 waren neutrale Harze. Träger 8 und Träger 9 stellten Harze dar, die zusätzlich Carboxylgruppen trugen.

3.3.2.1. Einfluß von Sauerstoff auf die Immobilisierungsreaktion

Zu Beginn der systematischen Untersuchungen der Immobilisierungsreaktionen an Trägern aus Poly(acrylnitril) wurde geprüft, ob Sauerstoff hier einen Einfluß auf das Immobilisierungsergebnis hat. Dazu wurden zwei verschiedene Pufferlösungen nach Britton und Robinson mit pH-Werten von 5,0 und 8,0 mit Sauerstoff oder Stickstoff gespült und dann darin das zu immobilisierende thiollierte α -Chymotrypsin (tc 23) gelöst. Die Immobilisierungsreaktion an je etwa 50 mg Träger 5 wurde in 1,6-pro-

zentiger Enzymlösung bei 0°C durchgeführt. Sie wurde nach zwei Stunden durch Auswaschen des nicht fixierten Enzyms aus dem Polymeren beendet. In Tabelle 25 sind die Ergebnisse dieser Versuche zusammengefaßt.

Tab.25. Immobilisierung von thioliertem α -Chymotrypsin (tc 23) an Träger 5 in Stickstoff- und Sauerstoffatmosphäre

pH	gebundene Enzym- menge ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)	Aktivität ($\text{U} \cdot \text{g}^{-1}$)	relative Aktivi- tät (Prozent)	Gas
5,0	115,4	1006	4,98	O ₂
8,0	115,4	873	4,32	O ₂
5,0	101,2	977	5,52	N ₂
8,0	96,2	881	5,23	N ₂

Bedingungen bei den Immobilisierungsreaktionen:

Je etwa 50 mg Träger 5 und 27,92 mg thioliertes α -Chymotrypsin (tc 23) in 1,80 cm³ Britton-Robinson-Puffer wurden zwei Stunden bei 0°C durchgemischt. Die gebundenen Enzymmengen wurden nach Folin-Ciocalteu bestimmt, die Aktivitäten durch pH-statische Titration bei 25°C und pH 8,5 in 0,020 M ATEE (0,020 M an TRIS-HCl und 0,200 M an NaCl) mit 0,10 M Natronlauge.

Aus den Werten geht hervor, daß eine reine Sauerstoffatmosphäre zu geringfügig erhöhter Menge gebundenen Enzyms führte. Die katalytische Aktivität dieser Immobilisate war aber bei gleichem pH-Wert bei der Immobilisierungsreaktion in beiden Fällen fast gleich mit derjenigen der Immobilisate, die in reiner Stickstoffatmosphäre hergestellt wurden. Deshalb war die relative Aktivität der in der Sauerstoffatmosphäre gewonnenen Immobilisate etwas geringer. Der pH-Wert bei der Immobilisierungsreaktion wirkte sich hier kaum auf die gebundene Enzymmenge aus, hatte aber Einfluß auf die Aktivität der Immobilisate; es ist deshalb unter diesen Bedingungen günstiger, bei niedrigem pH zu immobilisieren. Die Menge des immobilisierten Proteins ist mit 115 mg je Gramm Träger hier höher, als bei einem vergleichbaren Immobilisat aus Poly(vinylalkohol). Dort konnten von Träger 3 in zwei Stunden bei 0°C und pH 6,0 aus einer 1,5-prozentigen Lösung von thioliertem α -Chymotrypsin (tc 23) nur

31,3 mg des Enzyms je Gramm Träger immobilisiert werden.

3.3.2.2. pH-Abhängigkeit der Immobilisierungsreaktion an den Trägern 5 und 9

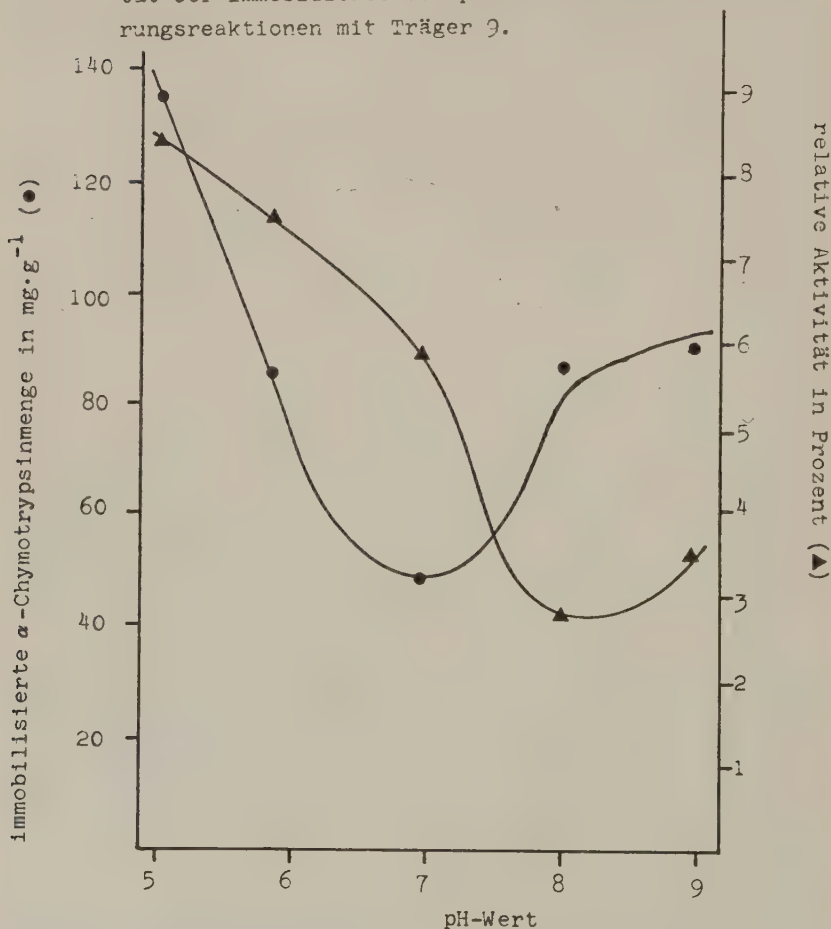
Der pH-Wert und die Ionenstärke des bei den Immobilisierungsreaktionen verwendeten Puffersystems beeinflusst nicht nur die Eigenschaften des zu immobilisierenden Enzyms und die der Maleinimidgruppen am Träger, sondern beim Träger 9 auch dessen Quellung in Wasser: Sie steigt oberhalb von pH 4 stark an, so daß sich das Schüttvolumen bei pH 10 versechsfacht. Im pH-Bereich zwischen pH 2 und pH 10 ist die Quellung des Trägers 9 reversibel. Daraus kann man entnehmen, daß in diesem pH-Bereich die Maleinimidgruppen am Träger noch nicht zerstört werden.

Die Resultate der pH-abhängigen Immobilisierungsreaktionen sind in den Abbildungen 34 bis 37 dargestellt. Von den Trägern 5 und 9 wurde bei steigendem pH-Wert und höherer Ionenstärke eine geringere Eiweißmenge gebunden. Wohl durch die größere Quellung bei hohen pH-Werten stieg oberhalb pH 7 die an Träger 9 fixierte Enzymmenge wieder an (Abbildung 34). Mit steigendem pH-Wert bei der Immobilisierungsreaktion nahm die relative Aktivität der Immobilisate ab. Bei pH 8,5 erreichte sie ein Minimum. Bei hohen pH-Werten bei der Immobilisierungsreaktion war die Aktivität der Immobilisate bedeutend niedriger, als bei kleinen pH-Werten (Abbildung 35). Einen Rückgang der Aktivität bei der Immobilisierung mit steigendem pH-Wert zeigten auch die Immobilisate an Träger 5 (Abbildung 36). Ursache dafür ist hier nicht die gesunkene relative Aktivität, sondern die geringere immobilisierte Enzymmenge bei hohen pH-Werten (Abbildung 37).

Bei den weiteren Untersuchungen der Immobilisierungsreaktionen an Trägern aus Poly(acrylnitril) wurde dem Träger 5 wegen seiner guten mechanischen Stabilität der Vorzug gegeben. Da dieser Träger keine Carboxylgruppen trägt, erlauben die Immobilisierungsreaktionen mit ihm eher einen Vergleich mit den reaktiven Trägern aus Poly(vinylalkohol), als Immobilisierungsreaktionen mit dem "sauren" Träger 9.

Aus dem in Abbildung 34 gefundenen Verlauf der relativen Aktivität wird gefolgert, daß die relative Aktivität bei kürzerer

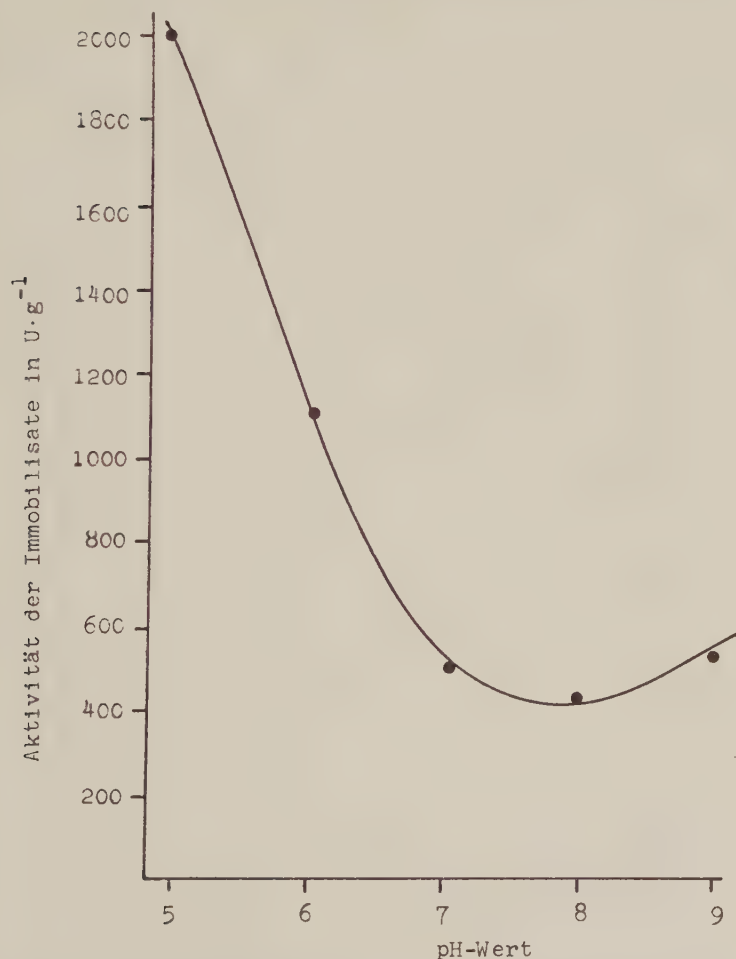
Abb. 34. Abhängigkeit der immobilisierten Menge von thiolier-tem α -Chymotrypsin (tc 23) und der relativen Aktivität der Immobilisate vom pH-Wert bei den Immobilisierungsreaktionen mit Träger 9.



Bedingungen bei den Immobilisierungsreaktionen:

Je etwa 50 mg Träger 9 und 29,90 mg thioliertes α -Chymotrypsin (tc 23) in 3,00 cm³ Britton-Robinson-Puffer wurden vier Stunden bei 0°C durchmischt. Die gebundenen Enzymmengen wurden nach Folin-Ciocalteu bestimmt, die Aktivitätswerte durch pH-statische Titration bei 25°C und pH 8,5 in 0,020 M ATEE (0,020 M an TRIS·HCl und 0,200 M an NaCl) mit 0,10 M Natronlauge.

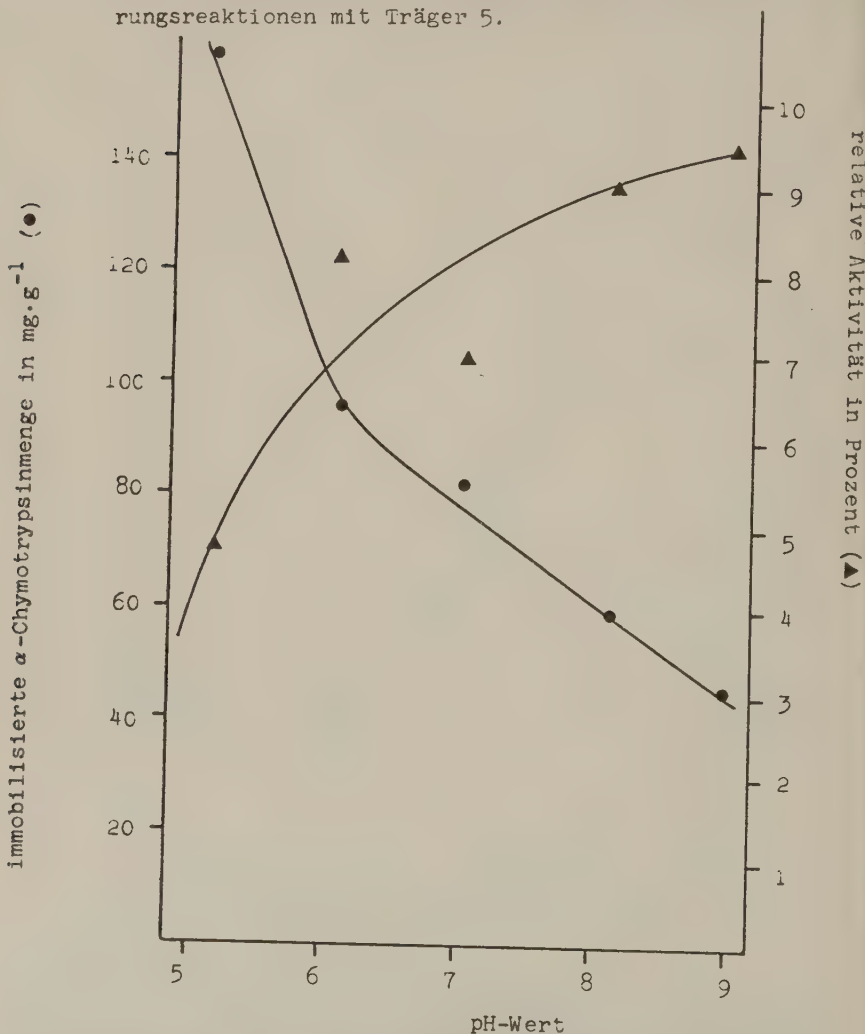
Abb.35. Auswirkung des pH-Wertes bei der Immobilisierungsreaktion von thiolisiertem α -Chymotrypsin (tC 23) an dem Träger 9 auf die Aktivität der erhaltenen Immobilisate.



Messung der Aktivitäten:

pH-statisch mit 0,10 M Natronlauge bei 25°C und pH 8,5 in 0,020 M ATEE (0,020 M an TRIS·HCl und 0,200 M an NaCl).

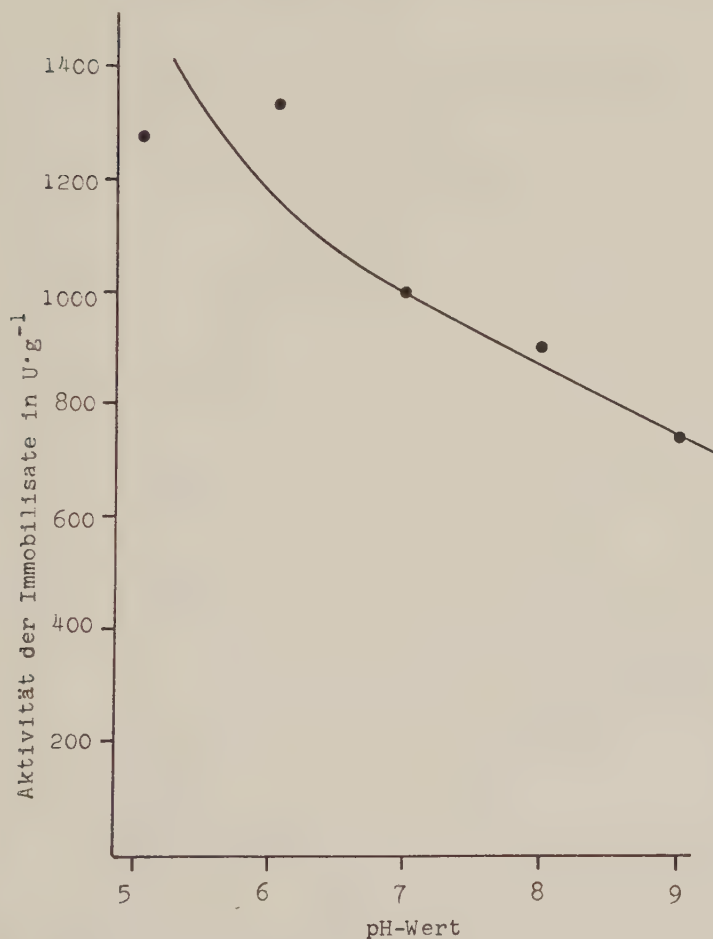
Abb.36. Abhängigkeit der immobilisierten Menge von thiolier-tem α -Chymotrypsin (tC 21) und der relativen Aktivität der Immobilisate vom pH-Wert bei den Immobilisierungsreaktionen mit Träger 5.



Bedingungen bei den Immobilisierungsreaktionen:

Je etwa 50 mg Träger 5 und 45,08 mg thioliertes α -Chymotrypsin (tC 21) in 4,50 cm^3 Britton-Robinson-Puffer wurden in 110 Minuten bei 22°C durchgemischt. Die gebundenen Enzymmengen wurden nach Folin-Ciocalteu bestimmt, die Aktivitätswerte durch pH-statische Titration bei 25°C und pH 8,5 in 0,020 M ATEE mit 0,10 M Natronlauge.

Abb.37. Auswirkung des pH-Wertes bei der Immobilisierungsreaktion von thioliertem α -Chymotrypsin (tC 21) an dem Träger 5 auf die Aktivität der erhaltenen Immobilisate.



Messung der Aktivitäten:

pH-statisch mit 0,10 M Natronlauge bei 25°C und pH 8,5 in 0,020 M ATEE (0,020 M an TRIS·HCl und 0,200 M an NaCl).

Dauer der Immobilisierungsreaktion höher sein wird, denn das Minimum der relativen Aktivitäten bei pH 8.5 weist auf die Eigenverdauung des Enzyms hin, die bei diesem pH-Wert ihre maximale Größe hat.

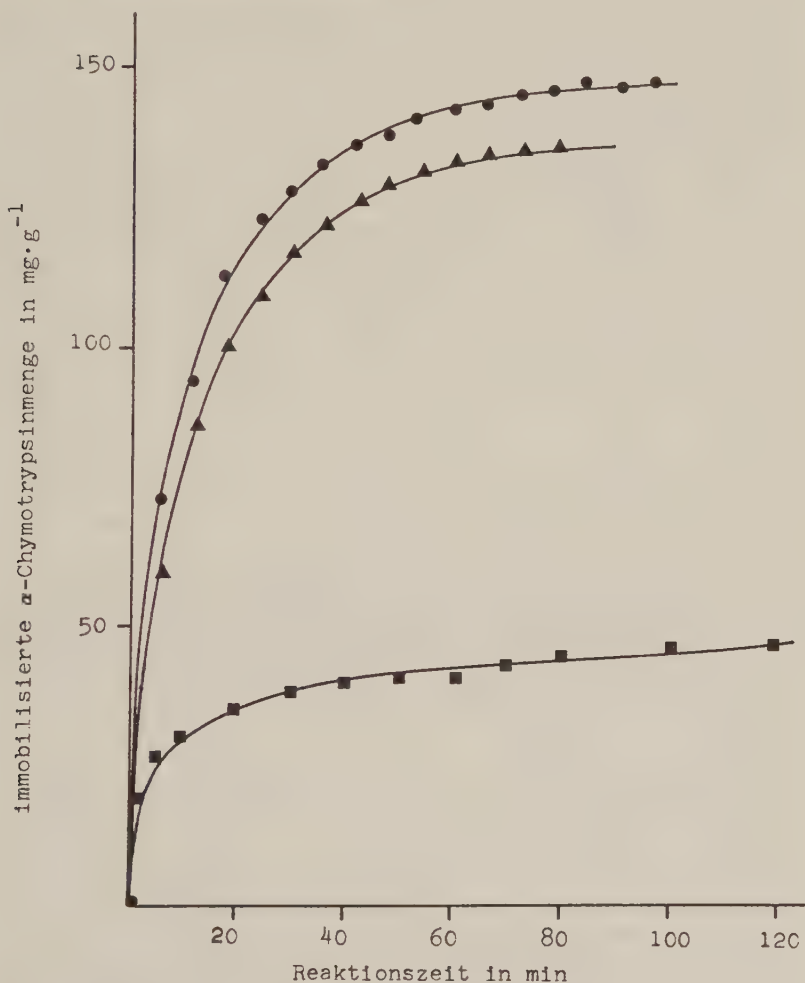
3.3.2.3. Zeitliche Abhängigkeit der Immobilisierungsreaktion

Die Immobilisierung großer Moleküle an die makromolekularen Träger mit Schwammstruktur geschieht an der inneren und an der äußeren Oberfläche der Harzpartikel. Das Eindringen der Enzymmoleküle benötigt eine gewisse Zeit, die unter anderem auch vom Konzentrationsgradienten des Enzyms im Träger abhängt. Bei den makroporösen Trägern wird wegen ihrer gegenüber Gelen lockereren Struktur mit einer erheblich höheren Geschwindigkeit der Immobilisierungsreaktion als bei den Gelen gerechnet.

Die am Träger 5 immobilisierte Enzymmenge war groß genug, so daß ohne gravierende Meßfehler direkt bei 278 nm die Immobilisierungsreaktion verfolgt werden konnte. Voraussetzung für diese direkte optische Kontrolle der Immobilisierungsreaktion war, daß die Messung nicht durch ionische oder adsorptive Bindung der Enzymmoleküle an den Träger verfälscht wurde. Durch die Messung von Blindwerten, bei denen nicht-thioliertes Enzym und Träger 5 zusammengebracht wurden, konnte sichergestellt werden, daß eine unspezifische Bindung an den Träger nicht stattfand.

Der Einfachheit halber wurde die Immobilisierung bei Raumtemperatur (22°C) ausgeführt. In einem zylindrischen Gefäß befanden sich Harz und Enzymlösung. Ein Teil der Lösung wurde durch eine Fritte abgesaugt und mit einer peristaltischen Pumpe durch eine Quarzdurchflußküvette gedrückt. Aus der Küvette konnte die Flüssigkeit wieder ins Reaktionsgemisch zurücklaufen. Die Verdunstungsverluste bei der dreistündigen Reaktion waren vernachlässigbar. In Abbildung 38 wird der zeitliche Verlauf der Immobilisierungsreaktionen von thioliertem α -Chymotrypsin (tc 19) aus 0,5-, 1,0- und 1,6-prozentiger Lösung an je etwa 50 mg Träger 5 bei pH 8,0 dargestellt. Die Tabelle 25 enthält immobilisierte Enzymmenge, Aktivität der erhaltenen Immobilisate, deren relative Aktivität und die Ausbeuten der beschriebenen Immobilisierungsreaktionen. Ein Vergleich der in dieser Tabelle aufgeführten immobilisierten Enzymmengen aus der Bestimmung nach Folin-Ciocal-

Abb.38. Zeitliche Abhängigkeit der Menge von immobilisiertem α -Chymotrypsin (tc 19) an Träger 5 bei verschiedenen Enzymkonzentrationen



Bedingungen bei den Immobilisierungsreaktionen:

Je etwa 50 mg Träger 5 und thioliertes α -Chymotrypsin (tc 19) in Britton-Robinson-Puffer pH 8,0 wurden bei 22°C durchgemischt. Die gebundene Enzymmenge wurde optisch bei 278 nm gemessen.

- (■) : 20,33 mg Enzym in 4,00 cm³ Puffer
- (●) : 40,01 mg Enzym in 4,00 cm³ Puffer
- (▲) : 64,08 mg Enzym in 4,00 cm³ Puffer

teu mit dem photometrisch ermittelten Wert ergab für den ungünstigsten Fall (Immobilisierung aus der 0,5-prozentigen Enzymlösung) nur eine Abweichung von etwa sieben Prozent. Als Folge der Aggregatbildung aus den α -Chymotrypsinmolekülen nahm oberhalb einer Enzymkonzentration von zirka einem Prozent die gebundene Eiweißmenge und die Immobilisierungsausbeute wieder ab (s. auch Abschnitt 3.3.1.5.).

Tab. 25. Immobilisate aus einer zweistündigen Reaktion von thio-
liertem α -Chymotrypsin (tc 19) mit Träger 5 bei pH 8,0
und 22°C bei verschiedenen Enzymkonzentrationen

Enzymkonz. (Prozent)	gebundene Enzym- menge ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)	Aktivität ($\text{U} \cdot \text{g}^{-1}$)	rel. Akt. (Prozent)	Immobilisat. Ausbeute (Prozent)
0,51	51,2	1123	12,8	11,9
1,00	166,0	1766	6,2	20,7
1,24	154,7	2676	10,1	14,5
1,60	125,8	1650	7,7	9,7

Bedingungen bei den Immobilisierungsreaktionen:

Je etwa 50 mg Träger 5 und thio- α -Chymotrypsin (tc 19) in Britton-Robinson-Puffer pH 8,0 wurden zwei Stunden bei 22°C durchmischt. Die gebundenen Enzymmengen wurden nach Folin-Ciocalteu bestimmt, die Aktivitätswerte durch pH-statistische Titration bei 25°C und pH 8,5 in 0,020 M ATEE mit 0,10 M Natronlauge.

Die Ergebnisse aus den Immobilisierungsreaktionen zeigten, daß nach zwei Stunden keine weitere Enzymaufnahme durch den Träger 5 mehr erfolgte (Abbildung 38). Die Abbildung zeigt auch, daß die Immobilisierungsreaktion umso schneller beendet war, je höher die angebotene Enzymmenge war. In keinem Fall wurde aber das gesamte angebotene Enzym immobilisiert, auch wenn nur sehr wenig Enzym zur Immobilisierung eingesetzt worden war. Die aus der Tabelle 25 ablesbaren relativen Aktivitäten bewegten sich in Größenordnungen, die von Immobilisaten mit Poly(vinylalkohol) bekannt waren.

3.3.2.4. Abhängigkeit der Immobilisierungsreaktion von der angebotenen Enzymmenge und der Enzymkonzentration

Die in Abbildung 38 aufgeführten Immobilisierungsreaktionen waren bei verschiedenen Enzymkonzentrationen aber konstantem Volumen der Reaktionslösung durchgeführt worden. Um entscheiden zu können, ob sich bei der Immobilisierung an Träger 5 die Enzymkonzentration oder die verfügbare Menge an Enzym besonders auswirkt, wurden weitere Immobilisierungsreaktionen durchgeführt, bei denen jeweils die gleiche Enzymmenge eingesetzt wurde und durch verschiedene Volumina der Enzymlösung verschiedene Enzymkonzentrationen eingestellt wurden. Wegen der Schwammstruktur des Trägers 5 wurde erwartet, daß die mögliche Bildung von Enzymaggregaten bei hoher Enzymkonzentration sich hier weniger stark auswirkt (Tabelle 26). Die hier immobilisierten Enzymmengen zeigten bei den verschiedenen Immobilisaten nur geringe Unterschiede auf.

Tab. 26. Auswirkung der Konzentration an thioliertem α -Chymotrypsin (tC 20) auf die Immobilisierungsreaktion am Träger 5 bei konstanter Enzymmenge

Enzymkonz. (Prozent)	immob. Enzym- menge ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)	Aktivität ($\text{U} \cdot \text{g}^{-1}$)	relative Akt. (Prozent)	Immobilisierungs- Ausbeute (Prozent)
0,69	205,3	1647	3,8	28,0
1,08	226,0	1502	3,2	30,6
1,51	235,4	1567	3,2	31,0
1,88	237,5	1549	3,1	31,4
2,51	235,6	1529	3,1	30,9

Bedingungen bei den Immobilisierungsreaktionen:

Je etwa 50 mg Träger 5 und 37,55 mg thioliertes α -Chymotrypsin (tC 20) wurden zwei Stunden bei 0°C in Britton-Robinson-Puffer pH 8,0 durchgemischt. Die gebundenen Enzymmengen wurden nach Folin-Ciocalteu bestimmt. Die Aktivitätswerte wurden durch pH-statistische Titration mit 0,10 M Natronlauge bei 25°C und pH 8,5 in 0,020 M ATEE-Lösung bestimmt.

Wegen der Durchführung der Immobilisierungsreaktion bei höherem pH-Wert und der Verwendung einer anderen Charge thiolierten α -Chymotrypsins (tC 20) wurden hier größere Mengen an En-

zym immobilisiert, als bei den Immobilisierungsreaktionen, die in Tabelle 25 aufgeführt sind. Es ist zu erkennen, daß die immobilisierte Enzymmenge mit fallender Enzymkonzentration leicht zurückging. Die Auswirkung der geringen an Träger 5 fixierten Enzymmenge auf die Aktivität der Immobilisate wurde durch gestiegene relative Aktivität bei kleiner Enzymkonzentration überkompensiert, so daß hier die höchste enzymatische Aktivität bei dem Immobilisat erhalten wurde, das bei der kleinsten Enzymkonzentration entstanden war.

Die Unterschiede in den Mengen an immobilisiertem Enzym entstanden also nicht durch unterschiedliche Enzymkonzentrationen sondern durch unterschiedliche Enzymmengen, die den reaktiven Trägern angeboten wurden.

Um dieses Ergebnis noch zu untermauern, wurden einige Immobilisierungsreaktionen durchgeführt, bei denen das Verhältnis von Enzymmenge zur Menge des Trägers in weiten Grenzen variiert wurde. In Tabelle 27 sind die wichtigsten Ergebnisse aus diesen Untersuchungen zusammengefaßt.

Tab. 27. Auswirkung des Verhältnisses von eingesetzter Enzymmenge (tc 23) zur Menge des Trägers 5 bei der Immobilisierung bei pH 6,0

Enzym- menge (mg)	Menge des Enzym- Trägers (mg)	Enzym- konz. (Prozent)	immob. Enzymmenge (mg·g ⁻¹)	Aktivität (U·g ⁻¹)	relat. Akti- vität (Prozent)
45,95	5,03	0,6	1350	1040	0,3
47,19	11,09	1,1	427	735	1,3
23,76	47,93	1,6	189	1228	2,7
17,14	50,93	1,6	132	1251	5,4

Bedingungen bei den Immobilisierungsreaktionen:

Träger 5 und thioliertes α -Chymotrypsin (tc 23) wurden vier Stunden bei 0°C in Britton-Robinson-Puffer pH 6,0 durchmischt. Die gebundenen Enzymmengen wurden nach Folin-Ciocalteu bestimmt und die Aktivitätswerte durch pH-statische Titration mit 0,10 M Natronlauge bei 25°C und pH 8,5 in 0,020 M ATEE-Lösung.

Man erkennt sehr deutlich, daß bei hohem Enzymangebot auch das meiste Enzym gebunden wurde. Es ist allerdings nicht sinnvoll, mit einem hohen Enzym-Träger-Verhältnis zu immobilisieren, da die relative Aktivität des immobilisierten Enzyms dann stark zurückgeht. Daher wurde trotz hoher immobilisierter Enzymmenge nur eine kleine Aktivität des Immobilisats erzielt. Selbst bei günstigsten Reaktionsbedingungen wurde auch hier niemals mehr als 40 Prozent des angebotenen Enzyms vom reaktiven Träger fixiert. Deshalb wurde vermutet, daß die eingesetzten Enzymmoleküle nicht einheitlich thioliert waren, so daß neben Enzymmolekülen mit vielen Thiolgruppen auch welche ohne SH-Gruppen vorlagen und deshalb nur ein Teil der eingesetzten Moleküle immobilisiert werden konnte.

3.3.2.5. Vergleich der Träger 5 bis 9 bei der Immobilisierung von thioliertem α -Chymotrypsin

Die Träger 5 und 6 unterschieden sich kaum. Durch die Aufnahme von Isododekan durch die porösen Harze konnte gezeigt werden, daß der Anteil der Hohlräume des Trägers 5 größer war, als der des Trägers 6. Der Träger 7 wies eine Gelstruktur auf. Er war in Wasser nicht quellbar und konnte nur sehr geringe Enzymmengen immobilisieren. Die sauren Träger 8 und 9 sollten durch eine der kovalenten Bindung vorgeschaltete ionische Bindung schneller reagieren und dadurch mehr Protein binden können, als die ungeladenen Träger. Träger 9 hatte einen fast doppelt so hohen Maleinimidgruppengehalt und eine höhere Quellbarkeit, als Träger 8. Der Aufbau der Träger wirkte sich in erwarteter Weise aus. Die Zusammenstellung der Ergebnisse einiger Immobilisierungsreaktionen des thiolierten α -Chymotrypsins (tc 19) an den Trägern 5 bis 9 in Tabelle 28 beweist, daß der Träger 7 zur Immobilisierung nicht gut geeignet war. Träger 9 mit der großen Anzahl reaktiver Gruppen und der größten Quellbarkeit konnte auch die größte Enzymmenge binden und bildete Immobilisate mit der höchsten Aktivität und relativen Aktivität. Vergleicht man die gebundene Enzymmenge an den Trägern 5 und 6 mit der an Träger 8, so kann daraus gesehen werden, daß die Anwesenheit der Carboxylgruppen im Träger 8 hier keine Erhöhung der

Tab.28. Immobilisierung von thiolisiertem α -Chymotrypsin (tc 19) bei pH 9,5 an die Träger 5 bis 9.

Träger	Maleinimid- gehalt (mMol·g ⁻¹)	gebundene Enzymmenge (mg·g ⁻¹)	Aktivität (U·g ⁻¹)	relative Aktivität (Prozent)	Immobilis. Ausbeute (Prozent)
5	2,10	93,7	404	2,5	10,6
6	1,80	92,3	472	3,0	10,1
7	1,17	25,2	23	0,5	3,0
8	0,97	95,7	594	3,6	10,6
9	1,73	177,4	1330	4,4	19,2

Bestimmung des Maleinimidgehaltes der Träger: Abschnitt 3.1.2.3.
Bedingungen bei den Immobilisierungsreaktionen:

Je etwa 50 mg des Trägers und 44,36 mg thiolisiertes α -Chymotrypsin (tc 19) in 1,50 cm³ Britton-Robinson-Puffer pH 9,5 wurden vier Stunden bei 0°C durchmischt. Die gebundenen Enzymmengen wurden nach Folin-Ciocalteu bestimmt, die Aktivitäten durch pH-statische Titration mit 0,10 M Natronlauge bei 25°C und pH 8,5 mit 0,020 M ATEE-Lösung.

immobilisierten Enzymmenge herbeiführt, da von diesem Träger etwa die gleiche Enzymmenge gebunden wurde, wie von den Trägern 5 und 6.

3.3.2.6. Immobilisierung weiterer thiolierter Enzyme an den Trägern 5 und 9.

Die Abhängigkeit des Schüttvolumens des Trägers 9 vom pH-Wert führte dazu, daß nur im Bereich von pH-Werten oberhalb von pH 6, die eine merkliche Zunahme der Quellung des Trägers 9 herbeiführten, größere Mengen an Enzym von diesem Träger als von Träger 5 gebunden wurden. Dieser Effekt ist gut aus Tabelle 29 zu ersehen. Hier sind immobilisierte Enzymmengen, Aktivitäten und relative Aktivitäten von Immobilisaten aufgeführt, die durch Immobilisierung verschiedener thiolierter Enzyme an den Trägern 5 und 9 bei pH 6,0 entstanden sind.

Bei der Immobilisierung bei pH 6,0 wurde weniger Enzym vom Träger 9 als vom Träger 5 gebunden, weil im wenig gequollenen Zustand wahrscheinlich die Hohlräume des Trägers 9 kleiner sind, als die des Trägers 5. Nur im Fall des Lysozyms wurde bei pH 6,0 vom Träger 9 mehr Enzym gebunden, als vom Träger 5. Dies könnte

Tab.29. Immobilisierung verschiedener Enzyme an die Träger 5 und 9 bei pH 6,0

Enzym	Charge	gebundene Enzym- menge ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)	Aktivität ($\text{U} \cdot \text{g}^{-1}$)	rel.Akt. (Prozent)	Träger
α -Chymotryps.	tC 23	68,3	654	5,47	5
"	"	22,8	617	15,46	9
Trypsin	tT 14	203,3	279	6,08	5
"	"	99,7	385	17,05	9
RNase	tR 1	183,1	144	4,64	5
"	"	144,9	304	12,40	9
Lysozym	tL 5	45,8	13151	0,87	5
"	"	304,7	1061	0,01	9

Bedingungen bei den Immobilisierungsreaktionen:

Je etwa 50 mg des Trägers und 19,75 mg des Enzyms in $1,30 \text{ cm}^3$ Britton-Robinson-Puffer pH 6,0 wurden vier Stunden bei 22°C durchmischt. Die gebundenen Enzymmengen wurden nach Folin-Ciocalteu bestimmt und die Aktivitätswerte durch pH-statische Titration ermittelt (mit Ausnahme der Aktivität des Lysozyms, die durch Spaltung von M.Lyso-deicticus photometrisch ermittelt wurde).

darauf zurückzuführen sein, daß das Lysozym mit seinem hohen isoionischen pH-Wert von den Carboxylatgruppen dieses Trägers zunächst ionisch gebunden wird.

Mit Ausnahme des Lysozyms wiesen Immobilisate am Träger 9 die höchste relative Aktivität auf. Wahrscheinlich wirkt dieser Träger als Puffer und sorgt so für einen schnelleren Abtransport des jeweils sauren Produktes der enzymatischen Reaktion. Dies erklärt auch, weshalb nur beim Lysozym die höhere relative Aktivität beim Immobilisat aus Träger 5 gefunden wurde: Hier ist das Produkt der enzymatischen Spaltung neutral, das Substrat kann das Enzym an der Oberfläche des lockeren Trägers 5 besser erreichen.

3.3.2.7. Immobilisierung von Enzymen mit eigenen SH-Gruppen am Träger 5

Die Enzyme Urease und Katalase tragen eigene SH-Gruppen und brauchten deshalb vor der Immobilisierung an Trägern mit Maleinimidgruppen nicht thioliert zu werden. In Tabelle 30 sind die Ergebnisse der Immobilisierung dieser Enzyme am Träger 5

bei pH 6,0 aufgeführt.

Tab.30. Immobilisierung von Urease und Katalase am Träger 5

Enzym	gebundene Enzym- menge ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)	Aktivität ($\text{U} \cdot \text{g}^{-1}$)	relative Aktivität (Prozent)
Urease	24,4	766	62,8
Katalase	85,5	5645	0,1

Bedingungen bei den Immobilisierungsreaktionen:

Je etwa 50 mg Träger 5 und etwa 20 mg des Enzyms wurden in 4,00 cm³ Britton-Robinson-Puffer pH 6,0 (Katalase: pH 8,0) bei 0°C zwei Stunden durchmischt. Die immobilisierte Enzymmenge wurde nach Folin-Ciocalteu bestimmt und die Aktivität des Immobilisats aus Urease pH-statisch mit Salzsäure, die des Immobilisats aus Katalase absorptiostatisch ermittelt.

Die Urease, die ein höheres Molekulargewicht als die Katalase hat, wurde in geringerer Menge immobilisiert. Die sehr hohe Aktivität der Katalase wurde bei der Immobilisierung stark herabgesetzt. Möglicherweise verstopft der durch die Peroxidspaltung gebildete Sauerstoff bei der enzymatischen Reaktion die Poren des Immobilisats und verhindert den Zugang des Substrats zum gebundenen Enzym.

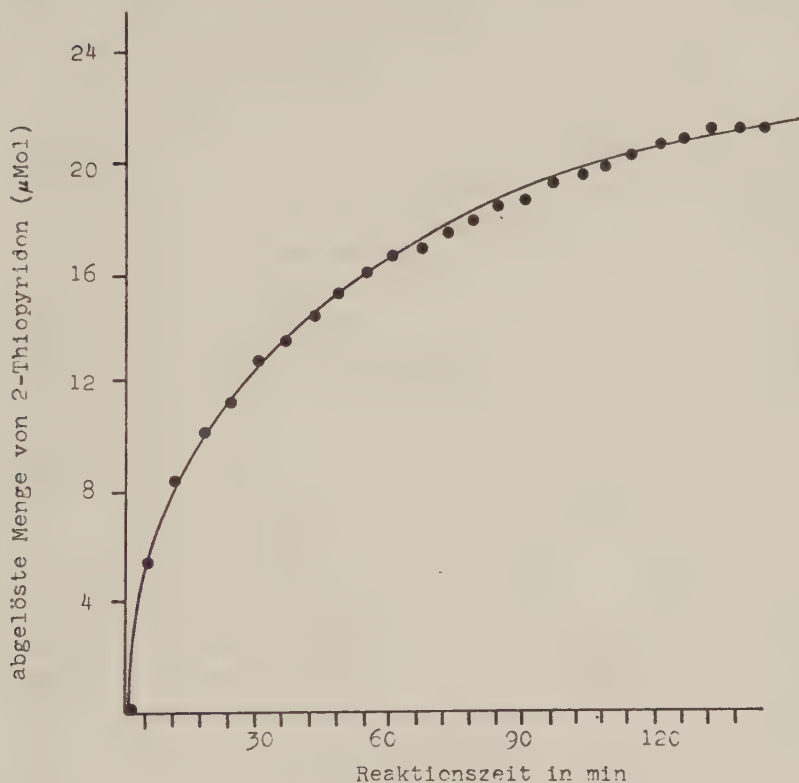
3.3.2.8. Kovalente Chromatografie von thioliertem α -Chymotrypsin.

Es sollte hier untersucht werden, inwieweit eine Steigerung der Ausbeute an immobilisiertem Enzym möglich ist, wenn nicht thioliertes Enzym aus dem Thiolierungsgemisch abgetrennt wird. Diese Trennung des nicht thiolierten vom thiolierten Enzym kann durch kovalente Chromatografie erreicht werden.

Das hier ausgewählte System zur kovalenten Chromatografie aus Thiopropylsephadex G 50 (Träger 17) und 2-Thiopyridon gibt über die Lichtabsorption des vom reaktiven Träger freigesetzten 2-Thiopyridons bei 343 nm die Möglichkeit, den Verlauf dieser Chromatografie zu verfolgen¹¹².

Zur Immobilisierung an das aktivierte Sephadex-Derivat wurde thioliertes α -Chymotrypsin (tC 16) eingesetzt. Diese Enzymcharge besaß den hohen durchschnittlichen SH-Gruppengehalt von 5,67 Thiolgruppen je Enzymmolekül. Das durch Thiopyridon akti-

Abb.39. Ablösung von 2-Thiopyridon vom Träger 17 bei der Immobilisierung von thiolisiertem α -Chymotrypsin (tC 16).



Reaktionsbedingungen:

146 mg thiolisiertes α -Chymotrypsin (tC 16) und 2,32 g Träger 17 (Trockengewicht) in 20,0 cm³ TRIS·HCl pH 7,2 wurden bei 22°C umgesetzt. Die abgegebene Menge an 2-Thiopyridon wurde bei 343 nm in einer Durchflußkivette (d=0,100 cm) gemessen.

vierte Sephadex-Derivat (s. Abschnitt 3.1.3.3.) wurde in 10,0 cm³ 0,05 M TRIS·HCl vom pH 7,2 suspendiert und zu dieser Suspension 146 mg des thiolierten α -Chymotrypsins gegeben. Es wurden hier 10,3 g feuchtes Gel eingesetzt (Trockengewicht 2,32 g ; Gehalt an SH-Gruppen 350 μMol). Die Freisetzung von 2-Thiopyridon durch das thiolierte Enzym wurde durch Umpumpen eines Teils der Lösung durch eine Durchflußkivette verfolgt (Abbildung 39). Nach 150 Minuten wurde die Immobilisierung durch Waschen des Gels mit

dem beschriebenen Puffersystem abgebrochen.

Die Enzymmenge im Waschwasser, ihr Gehalt an Thiolgruppen und ihre Aktivität wurden gemessen. Aus der Aktivität einer Probe des erhaltenen Immobilisats wurde die gesamte am Träger 17 verfügbare enzymatische Aktivität errechnet.

Durch darauffolgende Reduktion mit 0.15 g Dithiothreitol in 10.0 cm³ des TRIS-Puffers wurde das immobilisierte α -Chymotrypsin wieder vom Träger abgespalten. Auch dieser Vorgang wurde optisch bei 278 nm verfolgt. Die Lösung mit dem abgetrennten Enzym wurde dann per Ultrafiltration eingengt und durch Gel-filtration von überschüssigem Reduktionsmittel und anderen niedermolekularen Beimengungen befreit. Anschließend wurde die Enzymmenge, ihr Thiolgruppengehalt und ihre Aktivität bestimmt. Die Ergebnisse der einzelnen Arbeitsschritte sind im folgenden zusammengestellt:

2,32 g Träger 17 (0,3596 mMol reaktive Gruppen)	+	146 mg thioliertes α -Chymotrypsin (tC 16) (5.7 SH je Enzymmolekül, insgesamt 33,29 μ Mol SH) Aktivität 237 U je mg
2,32 g Immobilisat (45 mg fixiertes Enzym, 21,7 μ Mol fixierte Thiolgruppen; Gesamtaktivität 7333 U)	+	101,4 mg nicht gebundenes Enzym (4,3 SH je Enzymmolekül, insgesamt 17,4 μ Mol SH) Aktivität 247 U je mg
2,32 g reduzierter Träger 17	+	22,9 mg abgelöstes Enzym (10,3 SH je Enzymmolekül, insgesamt 9,4 μ Mol SH) Aktivität 152 U je mg

Als Ergebnis der kovalenten Chromatografie wurde eine Charge des thiolierten α -Chymotrypsins (tC 16') erhalten, die einen sehr großen SH-Gehalt aufwies. Wegen der geringen Ausbeute an thioliertem Enzym ist diese Methode zur Vergrößerung der Anzahl an SH-Gruppen am Enzym aber praktisch nicht brauchbar. Es

ist außerdem zu sehen, daß das als Endprodukt erhaltene Enzym nur eine geringe Aktivität besitzt.

3.3.2.9. Immobilisierung des aus der kovalenten Chromatografie erhaltenen α -Chymotrypsins (tC 16')

Nach der Gelfiltration des vom Träger 17 abgelösten α -Chymotrypsins tC 16' wurde eine Lösung erhalten, die 22,98 mg des Enzyms enthielt. Nach der Bestimmung der Thiolgruppen am Enzym, der Enzymaktivität und der Enzymmenge wurde ein Teil der verbliebenen Enzymlösung mit Puffer nach Britton-Robinson auf pH 6,0 eingestellt und mit 50,83 mg des Trägers 5 zur Reaktion gebracht. Dabei kamen 9,16 mg tC 16' in 25,0 cm³ der Pufferlösung zum Einsatz. Die Enzymlösung war also nur 0,04-prozentig. Bei 0°C wurde zwei Stunden lang immobilisiert und das Immobilisat dann, wie bisher üblich, mit 1 M NaCl-Lösung auf 250 cm³ gewaschen.

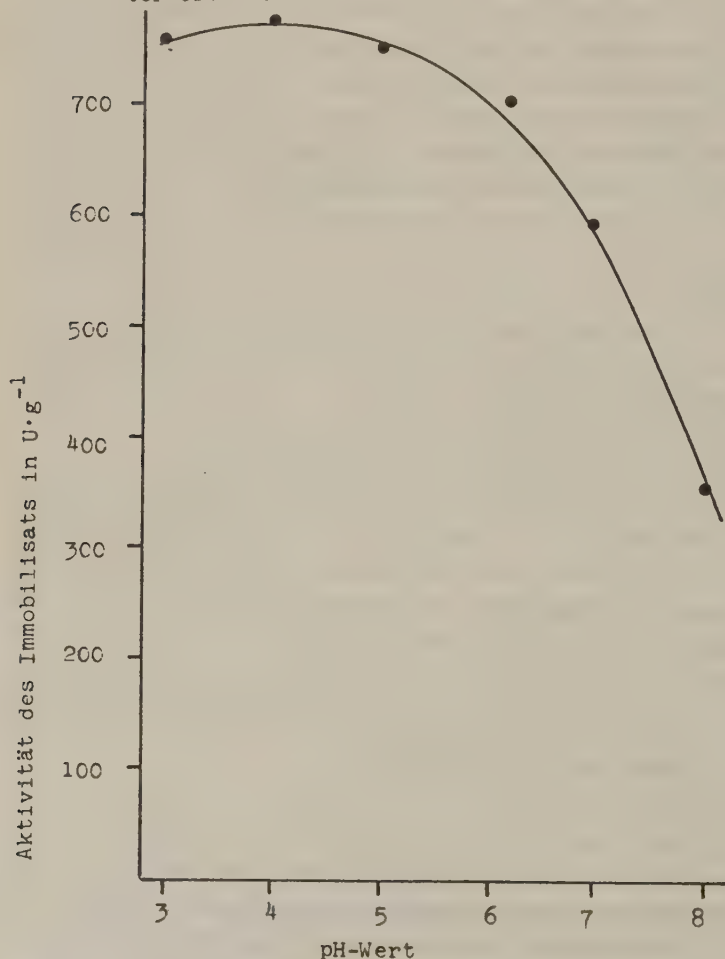
Trotz der sehr geringen Enzymkonzentration und der kleinen angebotenen Enzymmenge wurden nach der verhältnismäßig kurzen Immobilisierungsdauer 32,2 Prozent des angebotenen Enzyms an dem Träger fixiert. Das erhaltene Immobilisat trug je Gramm 58,1 mg α -Chymotrypsin, es hatte eine Aktivität von 820 U·g⁻¹, das gebundene Enzym wies also eine relative Aktivität von sieben Prozent auf. Obwohl sicher kein Enzymmolekül ohne SH-Gruppen im Immobilisierungsansatz vorhanden war und obwohl ein großer Überschuß des Trägers verwendet wurde, konnte die gesamte angebotene Enzymmenge nicht vom Träger gebunden werden.

3.3.2.10. Charakterisierung der Immobilisate an reaktiven Trägern aus Poly(acrylnitril)

Bedingt durch die Porosität der Träger aus Poly(acrylnitril) sind die reaktiven Maleinimidgruppen leicht von gelösten Reaktionspartnern erreichbar. Dadurch würde die Zeitdauer einer Immobilisierungsreaktion gegenüber Trägern aus Poly(vinylalkohol) in Gelform stark verkürzt. Die nach der Immobilisierungsreaktion polymer gebundenen Enzymmoleküle konnten von ihrem Substrat leicht erreicht werden. Deshalb waren die Eigenschaften der an die Träger 5 bis 9 immobilisierten Enzyme denen der löslichen Enzyme sehr ähnlich. So zeigten alle Enzyme an den

Trägern 5 bis 7 bis auf die Urease nach den Immobilisierungsreaktionen keine Abweichung der pH-Profile ihrer Aktivitäten. Die immobilisierte Urease erreichte hier ihre maximale Aktivität bei pH 3,5. Unterhalb pH 3,0 fiel ihre enzymatische Aktivität innerhalb kurzer Zeit irreversibel auf Null ab.

Abb. 40. pH-Profil der Aktivität von am Träger 5 immobilisierter Urease.



Aktivitätsmessung:

pH-statische Titration von 21,56 mg Immobilisat bei 30°C mit 0,10 M Salzsäure in 21 cm³ 0,17 M Harnstofflösung (0,010 M an TRIS·HCl und 0,100 M an NaCl).

In Abbildung 40 ist das pH-Profil der Aktivität der am Träger 5 immobilisierten Urease grafisch dargestellt. Die Verschiebung des pH-Profiles der Aktivität der immobilisierten Urease gegenüber dem Profil der Aktivität der gelösten Urease (s. Abbildung 14) zu kleineren pH-Werten kann dadurch erklärt werden, daß das eine Produkt der enzymatischen Spaltung, die Ammoniumionen, nicht schnell genug aus der Umgebung des Enzyms entfernt wurden und dadurch eine pH-Verschiebung in den alkalischen Bereich in der Enzymnähe erfolgte. Eine Erhöhung der H^+ -Ionenkonzentration (kleiner pH-Wert der Außenlösung) kompensiert diesen Effekt. Durch die im Alkalischen auftretende Rotfärbung der polymer gebundenen Maleinimidgruppen, die mit Thiolgruppen der Urease bereits reagiert haben, können die Zustände in der Nähe des Polymeren direkt gesehen werden: Nach Zugabe des Substrats wurde das Immobilisat sofort rot; die Farbe verschwand, wenn bei der pH-statistischen Titration durch Zusatz von Salzsäure der pH-Wert erniedrigt wurde.

Die Carboxylgruppen der Träger 8 und 9 bewirkten in der Umgebung des immobilisierten Enzyms eine Vergrößerung der Protonenkonzentration (Pufferwirkung), so daß die enzymatischen Aktivitäten der Immobilisate, hergestellt aus diesen Trägern, eine Verschiebung der pH-Profile ihrer Aktivitäten um eine pH-Einheit aufzeigten.

Es wurden die K_M -Werte einiger Immobilisate aus α -Chymotrypsin und den in diesem Kapitel beschriebenen Trägern bestimmt. Diese Wert ($K_M = 6,85 \cdot 10^{-3} \text{ Mol} \cdot \text{dm}^{-3}$) zeigten, daß zum Erreichen der maximalen Aktivität der Immobilisate kleinere Enzymkonzentrationen nötig waren, als dies bei Immobilisaten mit Trägern aus Poly(vinylalkohol) der Fall war (s. Abschnitt 3.3.1.10.).

Alle aus den Trägern 5 bis 9 dargestellten Immobilisate zeigten eine hohe Stabilität: Auch nach sehr langen Lagerungszeiten, zum Teil wochenlang bei Raumtemperatur und pH-Werten um pH 10 war kein Verlust der enzymatischen Aktivitäten festzustellen.

3.3.3. Immobilisierungsreaktionen von Proteinen an Trägern mit Thiolgruppen

Die erwarteten Vorteile einer Immobilisierungsreaktion von maleinimidgruppenhaltigen Enzymen an Trägern mit SH-Gruppen sind schon vorher erwähnt worden: Es wird von den Enzymen mit Maleinimidgruppen eine höhere Stabilität erwartet, als von denen mit Thiolgruppen. Außerdem veränderte die Modifizierung der Enzymmoleküle mit Maleinimidgruppen ihre Eigenschaften wenig.

Die Vorteile von Trägern mit Thiolgruppen sind ihre mannigfache Verwendbarkeit auch für Reaktionen mit anderen Gruppen als Maleinimidfunktionen. Ebenso ist ihre einfachere Darstellung von Vorteil.

3.3.3.1. Vergleich der thiolgruppenhaltigen Träger 10 bis 15 bei der Immobilisierung von maleinimidiertem α -Chymotrypsin untereinander

Bevor der Einfluß von pH-Wert, Temperatur, Enzymkonzentration und Reaktionsdauer auf die Immobilisierung untersucht wurde, sollte zunächst ermittelt werden, welcher der Träger für die Immobilisierung am besten geeignet ist (die Eigenschaften der Träger sind in Tabelle 8, Seite 41 aufgeführt). Hierzu wurden je etwa 50 mg der Träger in einer Lösung aus 36,89 mg maleinimidiertem α -Chymotrypsin (mC 5) in Britton-Robinson-Puffer vom pH 6,1 bei 0°C vier Stunden lang suspendiert. Anschließend wurde dann das überschüssige Enzym mit 1M NaCl-Lösung von den Trägern abgewaschen und seine Menge bestimmt.

Die instabilen Träger 11 und 12, bei denen die SH-Funktionen durch Acetalgruppen an den vernetzten Poly(vinylalkohol) gebunden waren, zeigten eine andauernde Hydrolyse der Acetalgruppen, so daß bei diesen Trägern die polymer gebundene Enzymmenge nicht bestimmt werden konnte. Der Träger 12 hatte nach der Immobilisierungsreaktion eine Aktivität von $251 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$ und das Immobilisat aus Träger 11 nur eine Aktivität von $50 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$. Träger 10 mit einer höheren Quellbarkeit konnte 12,4 mg Enzym je Gramm immobilisieren, das Immobilisat wies aber bei pH-statistischer Titration mit ATEE als Substrat keine enzymatische Aktivität auf. Die Träger 10 bis 12 erwiesen sich also für Immobilisierungsre-

aktionen als ungeeignet. Die Ergebnisse der Immobilisierungsreaktionen an die anderen SH-haltigen Träger (Träger 13-15) sind in Tabelle 31 aufgeführt.

Tab. 31. Immobilisierung von maleinimidiertem α -Chymotrypsin (mC 5) an den Trägern 13-15

Träger	Menge an immob. Enzym (mg · g ⁻¹)	Aktivität (U · g ⁻¹)	relative Akt. (Prozent)
13	27.8	615	11.0
14	18,1	19	0.5
15	17.3	96	2.8

Bedingungen bei den Immobilisierungsreaktionen:

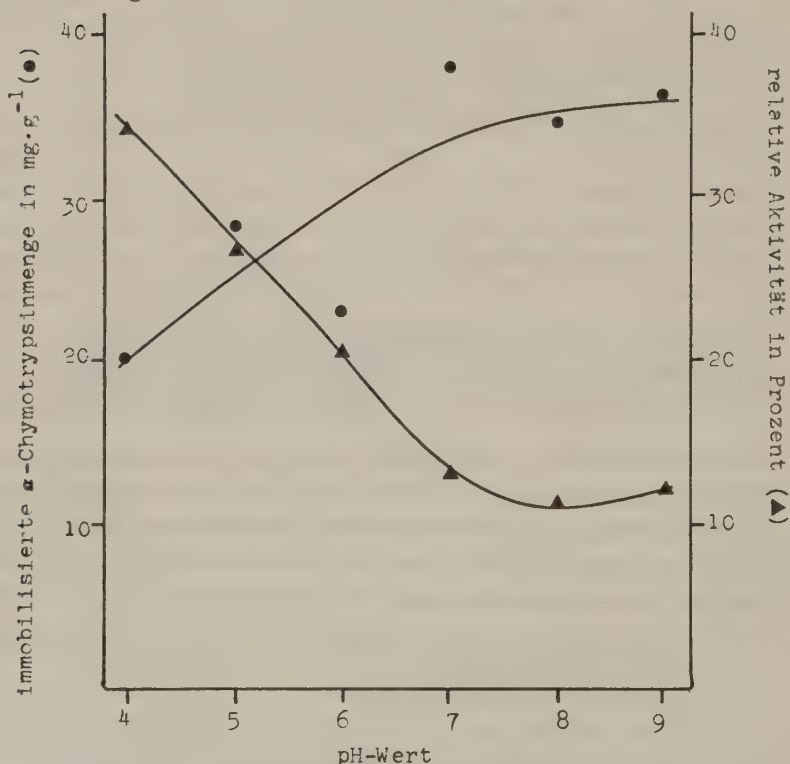
Je etwa 50 mg des jeweiligen Trägers und 36,89 mg maleinimidiertes α -Chymotrypsin (mC 5) in 3,30 cm³ Britton-Robinson-Puffer pH 6,1 wurden bei 0°C vier Stunden reagieren gelassen. Die immobilisierte Enzymmenge wurde nach Folin-Ciocalteu bestimmt, die Aktivität mit ATEE als Substrat bei pH 8,5.

Das Immobilisat aus Träger 13 wies die höchste Aktivität auf. Dies ist sicherlich auf seine verglichen mit den anderen Trägern hohe Quellbarkeit zurückzuführen (s. auch Tabelle 8). Alle weiteren Untersuchungen der Immobilisierungsreaktion von maleinimidiertem Enzym wurden deshalb mit diesem Träger durchgeführt.

3.3.3.2. pH-Abhängigkeit der Immobilisierung von maleinimidiertem α -Chymotrypsin (mC 4)

Die verschiedenen pH-Werte der Reaktionslösungen wurden wieder mit Britton-Robinson-Puffern eingestellt. Bei hohen pH-Werten wurde erwartet, daß die Maleinimidgruppen des Enzyms mit Aminogruppen reagieren und dadurch inter- und intramolekulare Verknüpfungen der Enzymmoleküle bewirken können. Eine intermolekulare Reaktion von Aminogruppen und Maleinimidgruppen führt zur Bildung von Enzymaggregaten, deshalb wurde eine Zunahme an immobilisiertem Enzym bei höheren pH-Werten erwartet. Wegen der Selbstverdauung des α -Chymotrypsins, die bei pH 8,5 maximal wird, sollte eine Immobilisierungsreaktion bei diesem pH-Wert zu Produkten mit geringer relativer Aktivität führen. In Abbildung 4I ist dieses schon bei der Immobilisierung von thioiliertem α -Chymotrypsin an Träger 1 beobachtete Verhalten wiederzufinden (s. auch Abbildung 23). Eine Abnahme der immobilisierten Enzymmenge bei hohem pH-Wert durch Hydrolyse von Ma-

Abb. 41. pH-Abhängigkeit der immobilisierten Enzymmenge und der relativen Aktivität bei der Immobilisierung von maleinimidiertem α -Chymotrypsin an dem thiolgruppenhaltigen Träger 13.

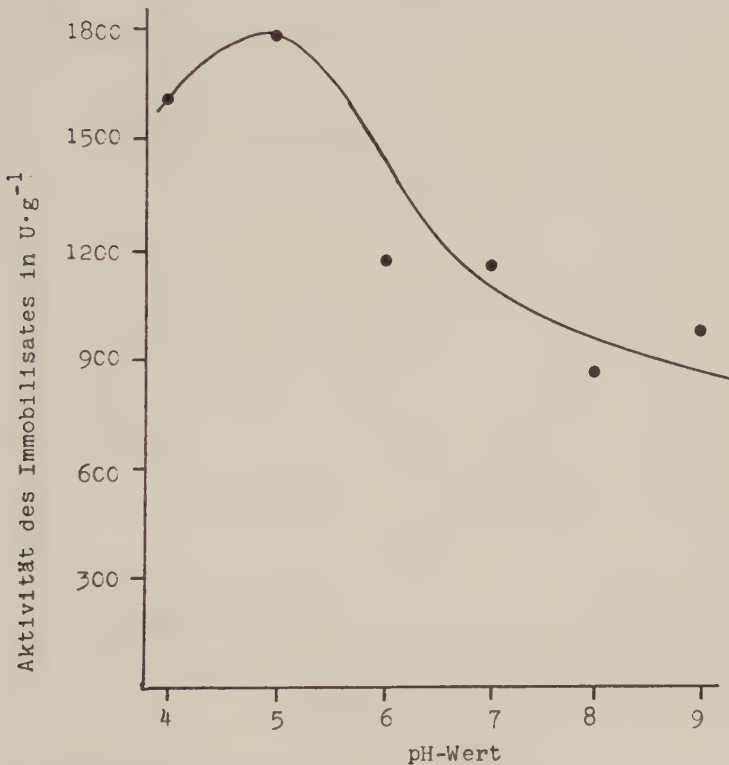


Bedingungen bei den Immobilisierungsreaktionen:

Je etwa 50 mg Träger 13 und 13,55 mg maleinimidiertes α -Chymotrypsin (mC 4) in 1,30 cm³ Britton-Robinson-Puffer wurden vier Stunden bei 0°C durchgemischt. Die gebundenen Enzymmengen wurden nach Folin-Ciocalteu bestimmt, die Aktivitätswerte durch pH-statische Titration mit 0,10 M Natronlauge bei 25°C und pH 8,5 mit 0,020 M ATEE-Lösung.

leinimidgruppen am Enzym wurde nicht beobachtet. In Abbildung 42 ist die Aktivität der erhaltenen Immobilisate dargestellt. Sie zeigte ein ausgeprägtes Maximum bei dem Immobilisat, das bei pH 5 dargestellt wurde.

Abb.42. Abhängigkeit der Aktivität der Immobilisate aus maleinimidiertem α -Chymotrypsin (mC 4) und Träger 13 vom pH-Wert bei der Darstellung

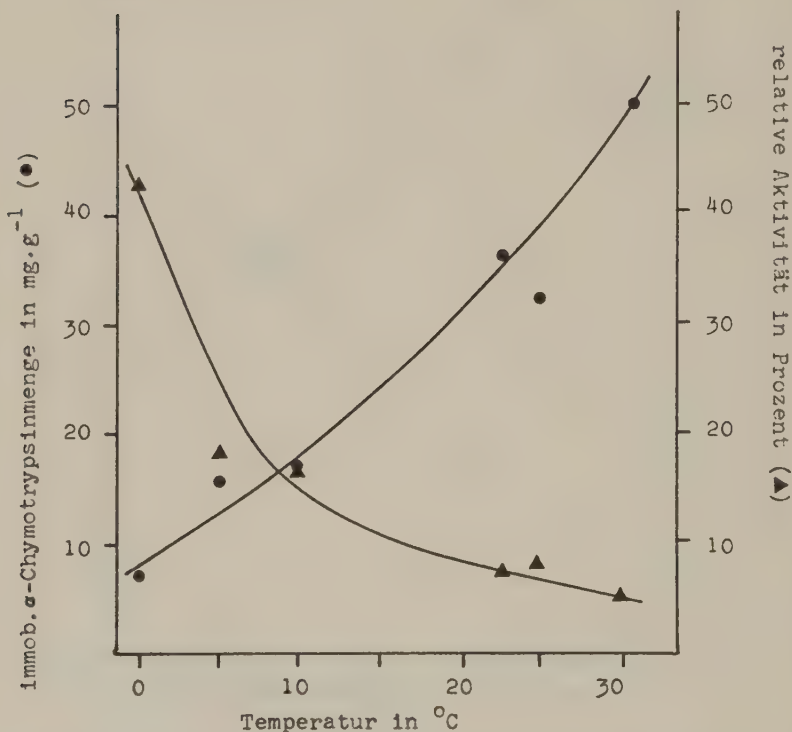


Aktivitätsmessung:

pH-statisch bei 25°C und pH 8,5 mit 0,10 M Natronlauge in 0,020 M ATEE-Lösung (0,020 M an TRIS·HCl und 0,200 M an NaCl).

Die hier erhaltene immobilisierte Enzymmenge wurde auch schon bei den Immobilisaten aus thioliertem α -Chymotrypsin und dem Träger 3 erreicht. Es soll hier jedoch hervorgehoben werden, daß die relative Aktivität der in diesem Abschnitt beschriebenen Immobilisate, verglichen mit der relativen Aktivität der Immobilisate, hergestellt mit thioliertem α -Chymotrypsin, wesentlich höher war. Somit ist die Verwendung von maleinimidiertem Enzym vorteilhaft.

Abb. 43. Abhängigkeit der immobilisierten Enzymmenge und der relativen Aktivität von der Temperatur bei der Immobilisierung von maleinimidiertem α -Chymotrypsin (mC 12) am Träger 13.



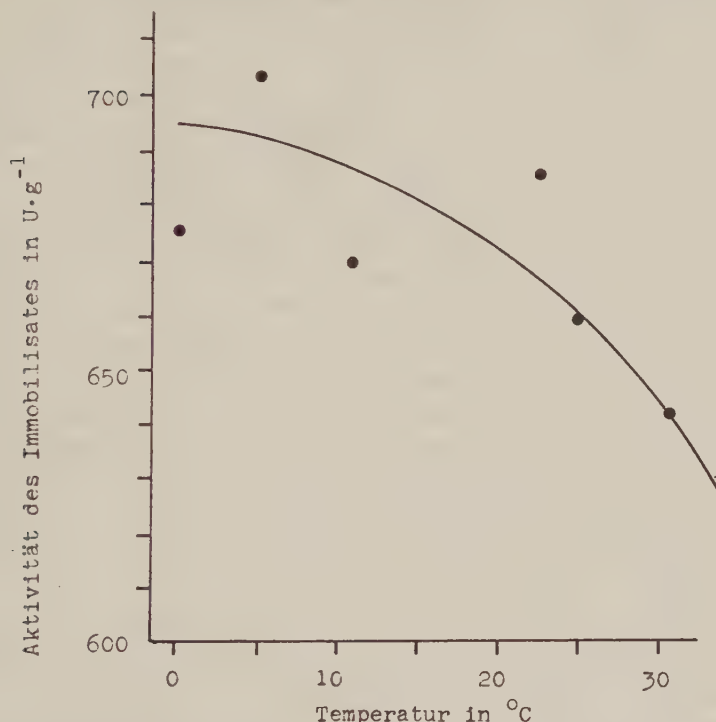
Bedingungen bei den Immobilisierungsreaktionen:

Je etwa 50 mg Träger 13 und 26,02 mg maleinimidiertes α -Chymotrypsin (mC 12) in 2,60 cm³ Britton-Robinson-Puffer pH 6,2 wurden vier Stunden durchgemischt. Die gebundenen Enzymmengen wurden nach Folin-Ciocalteu bestimmt, die Aktivitätswerte durch pH-statische Titration mit 0,10 M Natronlauge bei 25°C und pH 8,5.

3.3.3.3. Einfluß der Reaktionstemperatur auf die Immobilisierung von maleinimidiertem α -Chymotrypsin (mC 12)

Die große Ähnlichkeit der Ergebnisse der Immobilisierungsreaktionen von thiolisiertem und maleinimidiertem α -Chymotrypsin war auch bei der Temperaturabhängigkeit der Immobilisierungsreaktionen mit diesen Enzymen feststellbar. Dies ist aus den Abbildungen 43 und 44 zu erkennen. Mit steigender Temperatur

Abb. 44. Abhängigkeit der Aktivität der Immobilisate aus maleinimidiertem α -Chymotrypsin (μ C 12) an dem Träger 13 von der Temperatur bei der Immobilisierungsreaktion.



Aktivitätsmessung:

pH-statische Titration mit 0,10 M Natronlauge bei 25°C und pH 8,5 in 0,020 M ATEE-Lösung (0,020 M an TRIS·HCl und 0,200 M an NaCl).

sank die relative Aktivität von 43,3 Prozent auf 5,2 Prozent ab. Gleichzeitig nahm die immobilisierte Enzymmenge fast linear zu. Dies führte dazu, daß bei der Immobilisierung bei höheren Temperaturen Immobilisate erhalten wurden, die eine etwas geringere Aktivität aufzeigten, als diejenigen, die bei niedrigen Temperaturen hergestellt wurden. Somit sollte auch hier die Immobilisierung bei niedrigen Temperaturen erfolgen. Da die bei verschiedenen Temperaturen erhaltenen Immobilisate nur geringe Unterschiede in ihren Aktivitäten aufwiesen, ist in Abbildung 44 nur der Bereich von 600 U·g⁻¹ bis 700 U·g⁻¹ dargestellt.

3.3.3.4. Einfluß der Enzymkonzentration auf die Immobilisierung von maleinimidiertem α -Chymotrypsin (mC 8)

Die Immobilisierungsreaktionen bei verschiedenen Enzymkonzentrationen mußten bei pH 8 durchgeführt werden, da nur bei diesem höheren pH-Wert genügend Enzym löslich war. Es wurden je etwa 50 mg des Trägers 13 eingesetzt und 47,76 mg des derivatisierten Enzyms (mC 8). Die verschiedenen Enzymkonzentrationen wurden durch entsprechende Mengen an Pufferlösung eingestellt, es wurde vier Stunden bei 0°C immobilisiert.

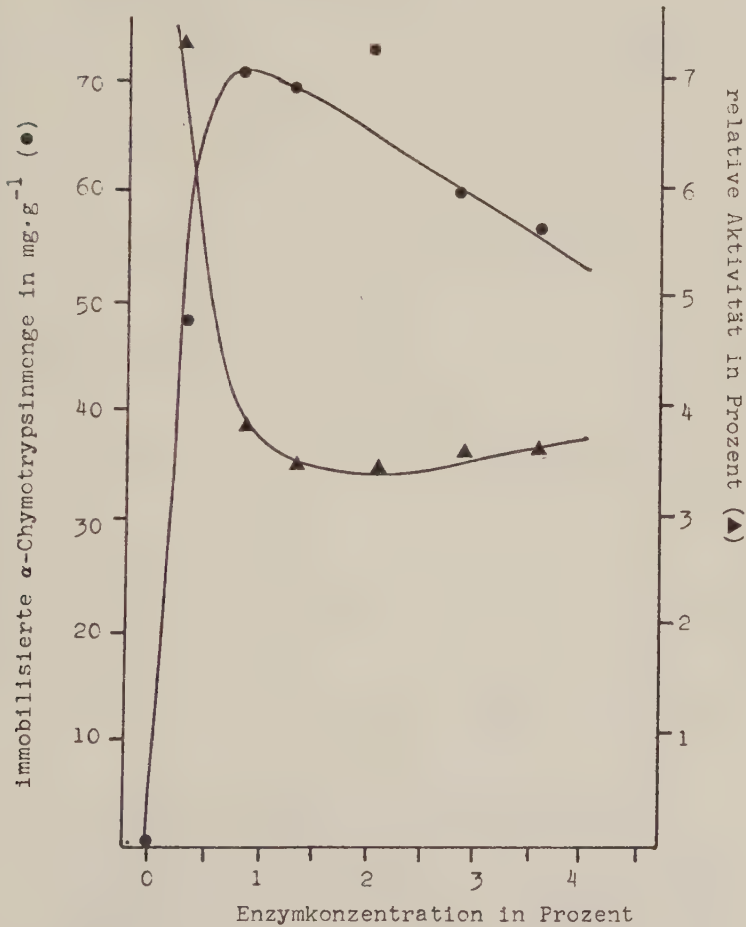
Aus der Abbildung 45 ist zu ersehen, daß auch das maleinimierte α -Chymotrypsin bei höheren Konzentrationen Aggregate bildete. Sie bewirkten, daß bei höherer Enzymkonzentration die immobilisierte Menge an α -Chymotrypsin wieder abnahm. Deshalb wurde die größte Enzymmenge aus der 1,0-prozentigen Enzymlösung an dem Träger gebunden. Die relative Aktivität erreichte ihren höchsten Wert bei dem Immobilisat, das die geringste Enzymmenge trug. Bei den Immobilisierungsreaktionen, die oberhalb einer α -Chymotrypsinkonzentration von 1,0 Prozent durchgeführt worden sind, hatte sich die relative Aktivität nur noch wenig geändert. Der höchste Wert der relativen Aktivität betrug hier 7,8 Prozent. Dies ist auf den verhältnismäßig hohen pH-Wert bei den Immobilisierungsreaktionen zurückzuführen. Die in Abbildung 45 dargestellte Abhängigkeit der immobilisierten Enzymmenge und der relativen Aktivität von der Enzymkonzentration bei der Darstellung der Immobilisat erklärt, warum die Aktivität bei höherer Enzymkonzentration bei den Immobilisierungsreaktionen stark zurückging (Abbildung 46).

3.3.3.5. Zeitliche Abhängigkeit der Immobilisierungsreaktion

Die Untersuchung der zeitlichen Abhängigkeit der Immobilisierungsreaktion von maleinimidiertem α -Chymotrypsin (mC 6) an dem Träger 13 wurde bei pH 6,8 und 0°C durchgeführt. Es wurden je Immobilisierungsansatz 37,59 mg des Enzyms in 3,30 cm³ Britton-Robinson-Puffer eingesetzt.

Es zeigte sich, daß auch nach sechs Stunden die Immobilisierungsreaktion noch nicht beendet war (Abbildung 47). Nach dieser Zeit hatte aber die Immobilisierungsgeschwindigkeit stark

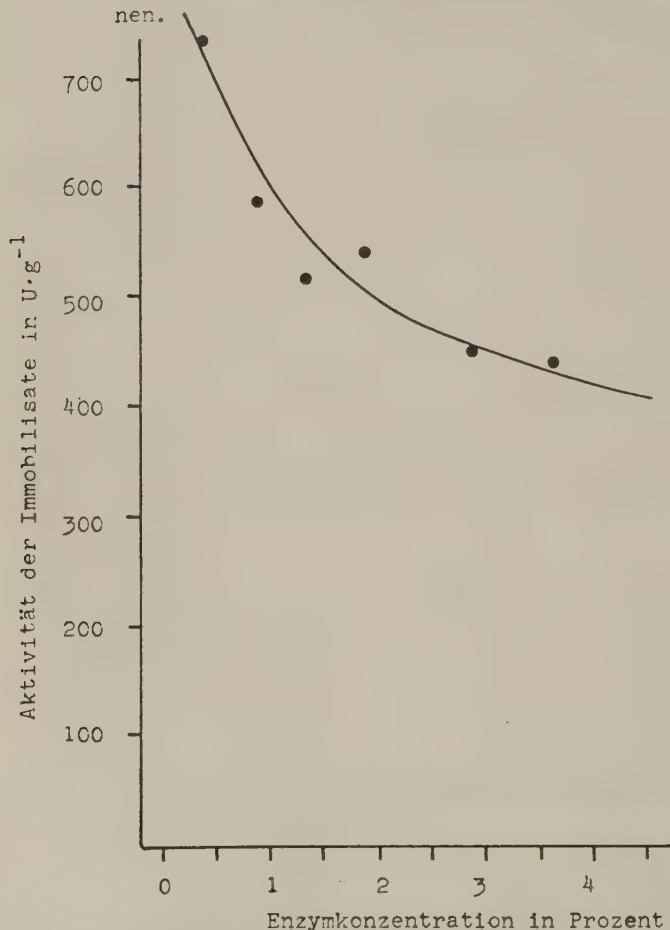
Abb.45. Abhängigkeit der immobilisierten Enzymmenge und der relativen Aktivität von der Konzentration an Enzym bei der Immobilisierung von maleinimidiertem α -Chymotrypsin am Träger 13.



Bedingungen bei den Immobilisierungsreaktionen:

Je etwa 50 mg Träger 13 und 47,76 mg maleinimidiertes α -Chymotrypsin (mC 8) in Britton-Robinson-Puffer pH 8,1 wurden vier Stunden bei 0°C durchmischt. Die gebundenen Enzymmengen wurden nach Folin-Ciocalteu ermittelt, die Aktivitätswerte durch pH-statische Titration mit 0,10 M Natronlauge bei 25°C und pH 8,5 in 0,020 M ATEE-Lösung.

Abb.46. Abhängigkeit der Aktivität der Immobilisate von maleinimidiertem α -Chymotrypsin (mC 8) an dem Träger 13 von der Enzymkonzentration bei den Immobilisierungsreaktionen.

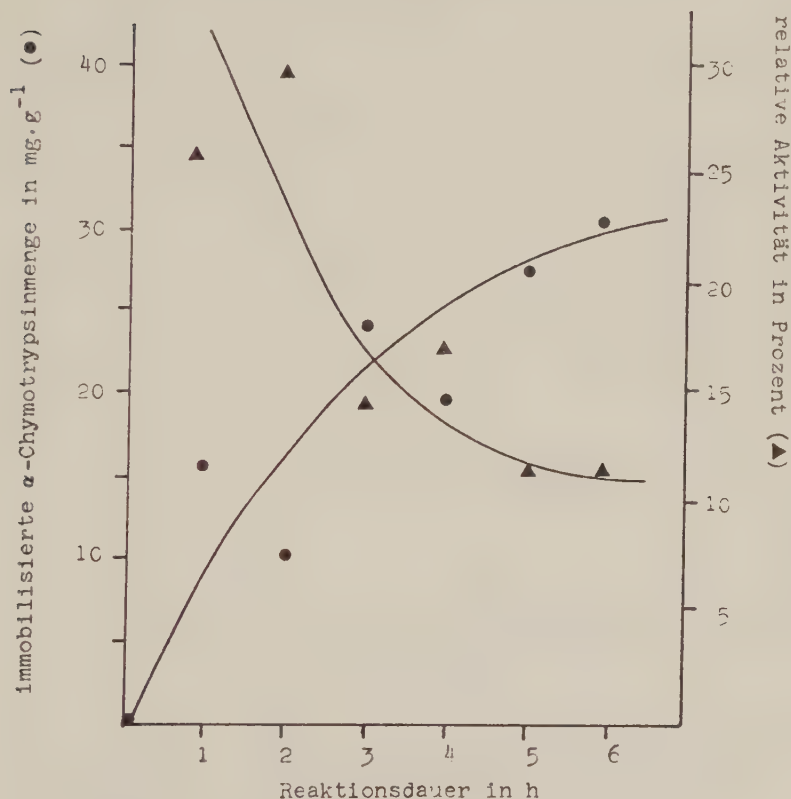


Aktivitätsmessung:

pH-statische Titration bei 25°C und pH 8,5 mit 0.10 M Natronlauge in 0.020 M ATEE-Lösung (0.020 M an TRIS-HCl und 0.200 M an NaCl).

abgenommen. Mit steigender Reaktionsdauer war eine Abnahme der relativen Aktivität verbunden. Wurde nur kurze Zeit immobilisiert, so erreichte die relative Aktivität Werte von 25 bis 40 Prozent. Es wurden Immobilisate mit höherer Aktivität erhalten, wenn die Reaktionszeit größer war.

Abb. 47. Zeitliche Abhängigkeit der gebundenen Proteinmenge und der relativen Aktivität der Immobilisate bei der Immobilisierung von maleinimidiertem α -Chymotrypsin (mC 6) an dem Träger 13.

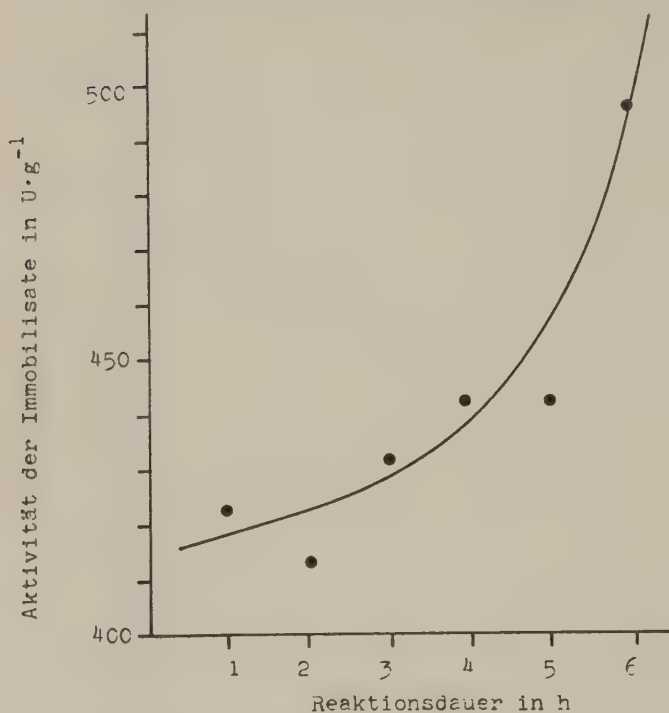


Bedingungen bei den Immobilisierungsreaktionen:

Je etwa 50 mg Träger 13 und 37,59 mg maleinimidiertes α -Chymotrypsin (mV 6) in $3,30 \text{ cm}^3$ Britton-Robinson-Puffer pH 6,8 wurden bei 0°C durchmischt. Die gebundenen Enzymmengen wurden nach Folin-Ciocalteu bestimmt, die Aktivitätswerte durch pH-statistische Titration bei 25°C und pH 8,5 mit 0,10 M Natronlauge in 0,020 M ATEE-Lösung.

Diese Unterschiede waren allerdings gering, deshalb wurde in der Abbildung 48 nur der Bereich zwischen $400 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$ und $500 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$ dargestellt.

Abb. 48. Abhängigkeit der Aktivität der Immobilisate aus maleinimidiertem α -Chymotrypsin (mC 6) am Träger 13 von der Dauer der Immobilisierungsreaktion.



Aktivitätsmessung:

pH-statische Titration bei 25°C und pH 8.5 mit 0,10 M Natronlauge in 0,020 M ATEE-Lösung (0,020 M an TRIS-HCl und 0,200 M an NaCl):

3.3.3.6. Charakteristische Eigenschaften der Immobilisate von maleinimidiertem α -Chymotrypsin am Träger 13

Die Immobilisierung von maleinimidiertem α -Chymotrypsin führte zu höheren relativen Aktivitäten der Immobilisate, als die Immobilisierung von thioliertem α -Chymotrypsin. Die Menge des trägergebundenen Enzyms war aber bei der Immobilisierung von maleinimidiertem α -Chymotrypsin geringer, so daß die Aktivitätswerte der Immobilisate, die bei der Immobilisierung von thioliertem Enzym erreicht werden konnten, hier unterschritten wurden. Dies wird auf den geringen Gehalt an Thiolgruppen am Träger 13 zurückgeführt. Wegen der geringen Aktivitätswerte konnte auch keine Verschiebung des pH-Profiles der Aktivitäten beim immobilisierten α -Chymotrypsin gegenüber dem Profil des löslichen Enzyms festgestellt werden. Alle dargestellten Immobilisate wiesen eine gute Stabilität auf. In der Tabelle 32 sind die K_M - und V_{max} -Werte die immobilisierte Enzymmenge und die relative Aktivität von Immobilisaten aufgeführt, die bei verschiedenen pH-Werten dargestellt wurden.

Tab. 32. Abhängigkeit der K_M - und V_{max} -Werte sowie der relativen Aktivität und der immobilisierten Enzymmenge vom pH-Wert bei der Immobilisierung von maleinimidiertem α -Chymotrypsin (mC 4) am Träger 13

pH-Wert	K_M ($\text{Mol} \cdot \text{dm}^{-3}$)	V_{max} ($\text{U} \cdot \text{g}^{-1}$)	gebundene Enzym- menge ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)	relative Aktivität (Prozent)
4	$40 \cdot 10^{-3}$	1613	20,4	34,3
5	$30 \cdot 10^{-3}$	1852	28,2	27,6
6	$21 \cdot 10^{-3}$	1220	22,7	22,5
7	$16 \cdot 10^{-3}$	1087	37,7	13,1
8	$15 \cdot 10^{-3}$	980	34,2	11,2
9	$13 \cdot 10^{-3}$	1000	36,2	12,1

Bedingungen bei den Immobilisierungsreaktionen:

Je etwa 50 mg Träger 13 und 13,55 mg maleinimidiertes α -Chymotrypsin (mC 4) in 1,30 cm³ Britton-Robinson-Puffer wurden vier Stunden bei 0°C durchmischt. Die gebundenen Enzymmengen wurden nach Folin-Ciocalteu ermittelt, die Aktivitätswerte und die Michaelis-Konstanten durch pH-statische Titration mit 0,10 M Natronlauge bei 25°C und pH 8,5.

Es ist aus der Tabelle zu ersehen, daß ein niedriger pH-Wert bei den Immobilisierungsreaktionen sowohl zu höherer relativer Aktivität als auch zu höheren K_M -Werten führte. Auch die Werte der maximalen Aktivität der Immobilisate waren nach der Immobilisierung bei kleinen pH-Werten am größten. Die hier gefundenen K_M -Werte lagen in der gleichen Größenordnung, wie die K_M -Werte, die bei den Immobilisierungsreaktionen von thioliertem α -Chymotrypsin gefunden wurden (s. auch Abschnitt 3.3.1.10):

3.3.4. Immobilisierungsreaktionen an Trägern auf der Basis von Carbonsäureanhydrid

Die Immobilisierung von Proteinen mit Thiolgruppen an Träger, die durch Umsetzung von N-Methylolderivaten mit Polymeren auf der Basis von Maleinsäureanhydrid entstanden waren (Träger 18 bis 20. s. Abschnitt 3.1.4.4.) brachte unerwartete Ergebnisse: Bereits bei Vorversuchen, bei denen untersucht wurde, ob diese Träger überhaupt zur Immobilisierung von Enzym geeignet sind, wurde mit Träger 18 ein Immobilisat erhalten, das eine Aktivität von 3365 U je Gramm Träger aufwies. Unter den gewählten Reaktionsbedingungen (pH 6,0, 22°C, 1,65-prozentige Lösung von tC 14) wies der Träger 1, der auf Basis von Poly(vinylalkohol) entstanden war, nur ein Immobilisat mit einer Aktivität von 201 U·g⁻¹ vor.

Bei den später durchgeführten Immobilisierungsreaktionen, bei denen thioliertes Lysozym zur Immobilisierung eingesetzt wurde, konnte der Träger 18 von der angebotenen Enzymmenge 96,6 Prozent immobilisieren, obwohl das Enzym nur einen mittleren SH-Gehalt von 0,3 Thiolgruppen je Molekül aufwies. Damit war erwiesen, daß die Immobilisierung an dem Träger 18 nicht über die Reaktion von SH-Gruppen des Enzyms mit den Maleinimidgruppen am Träger erfolgte. Bei Immobilisierungsreaktionen, bei denen nicht-thioliertes α -Chymotrypsin an dem Träger 20 gebunden wurde, obwohl dieser Träger statt Maleinimidgruppen die Succinimidgruppierung trägt, konnte bewiesen werden, daß die Maleinimidgruppen bei der Immobilisierung an diesem Träger nicht partizipieren. Bei 22°C und pH 6,0 konnten aus der 1,5-prozentigen Enzymlösung durch den Träger 20 in vier Stunden 283,6 mg Enzym je Gramm immobilisiert werden. Die Aktivität des erhaltenen Immobilisats betrug 5339 U·g⁻¹. Es wurden 71 Prozent der angebotenen Enzymmenge vom Träger gebunden.

Ebenso konnte an diese Träger Papain unter Aktivitätserhalt immobilisiert werden, also erfolgte die Bindung dieses Enzyms an dem Träger nicht durch die einzige SH-Gruppe dieses Enzyms, da diese für die Aktivität des Papains essentiell ist. Die Immobilisierung wurde mit einer Papaincharge durchgeführt, die

zuvor durch Gelfiltration von niedermolekularen Beimengungen, insbesondere von stabilisierendem Cystein befreit worden war. Aus der 1,6-prozentigen Lösung des Enzyms konnten bei pH 6.3 und 22°C in vier Stunden 252,5 mg des Enzyms an dem Träger 18 immobilisiert werden. Das Immobilisat wies eine relative Aktivität von 24,0 Prozent auf.

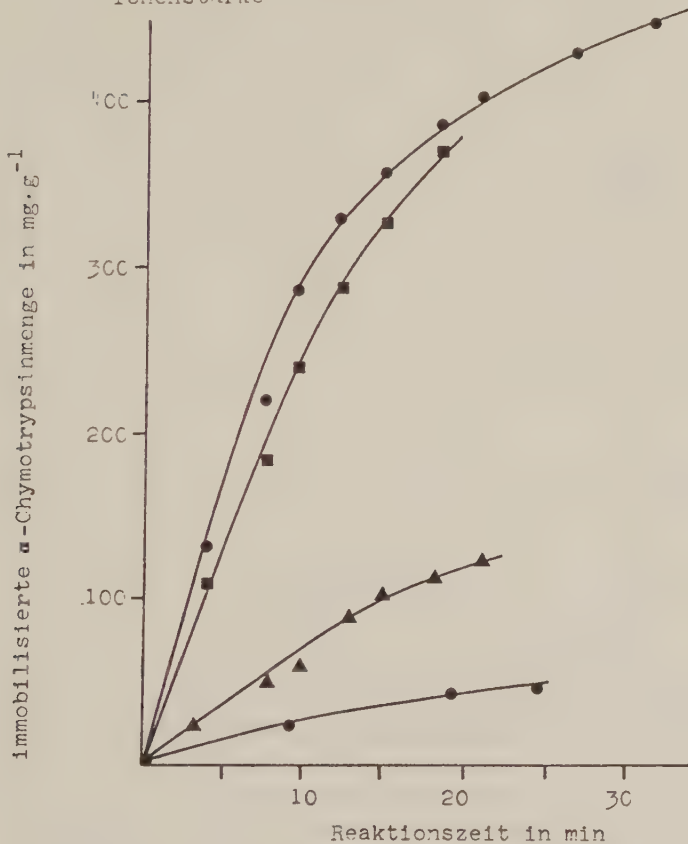
Die im folgenden beschriebenen Reaktionen, die mit den Trägern durchgeführt wurden, waren ein Versuch, den Mechanismus der Bindung von Enzym an die Träger zu erklären.

3.3.4.1. Auswirkung der Ionenstärke auf die Enzymaufnahme

Die Abhängigkeit der Menge von immobilisiertem Enzym von der Ionenstärke bei der Immobilisierungsreaktion wurde untersucht, als auffiel, daß von Immobilisierungsreaktion zu Immobilisierungsreaktion starke Unterschiede in der Menge des gebundenen Enzyms auftraten, die von Enzymkonzentration, Reaktionszeit, Temperatur oder pH-Wert nicht allein abhängig sein konnten. Zunächst wurde untersucht, wie die Schüttvolumina der reaktiven Träger von der Ionenstärke abhängig waren. Es wurde gefunden, daß sich die Ionenstärke hier nur wenig auswirkte. Ebenso konnte gezeigt werden, daß bei Zugabe eines Elektrolyten zum Reaktionsansatz das im Anfangsstadium der Umsetzung vom Träger aufgenommene Enzym wieder abgegeben wurde.

In Abbildung 49 ist die zeitliche Abhängigkeit der Aufnahme von α -Chymotrypsin durch den Träger 19 bei verschiedenen Ionenstärken dargestellt. Die Menge an aufgenommenem Enzym wurde aus der optischen Dichte der Enzymlösungen bei 278 nm in einer Durchflußküvette gemessen. Es wurde bei 20°C und pH 6.0 aus Lösungen immobilisiert, die in 10,0 cm³ des jeweiligen Puffers etwa 50 mg α -Chymotrypsin enthielten. Die Auswirkung der Ionenstärke war sehr deutlich: Hohe Ionenstärken verminderten die aufgenommene Enzymmenge sehr stark. Dieses Verhalten ist noch besser aus Abbildung 50 zu erkennen, wo die vom Träger 19 aufgenommene Enzymmenge nach gleicher Reaktionsdauer (12 Minuten) gegen die Konzentration an Na⁺-Ionen im Reaktionsansatz aufgetragen ist. Es ist zu erkennen, daß vom Träger 19 oberhalb einer Na⁺-Konzentration von 0,75 Mol·dm⁻³ innerhalb von zwölf Minuten kein Enzym mehr aufgenommen wurde. In Abbildung 49 ist außerdem die hohe Aufnahmegeschwindigkeit des Enzyms zu erken-

Abb.49. Zeitliche Abhängigkeit der Aufnahme von α -Chymotrypsin durch den Träger 19 in Puffern von verschiedener Ionenstärke

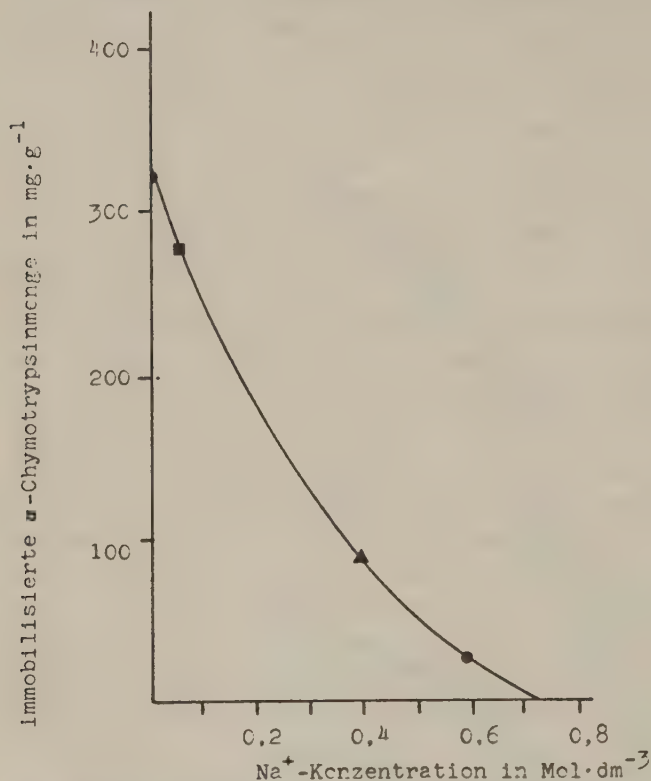


Bedingungen bei den Immobilisierungsreaktionen:

Je etwa 50 mg Träger 19 und 50 mg α -Chymotrypsin wurden in 10,0 cm³ Puffer bei pH 6,0 und 20°C durchmischt. Die Bestimmung der gebundenen Enzymmengen erfolgte optisch in einer Durchfluszküvette bei 278 nm ($d = 0,100$ cm).

- 0,59 M Na⁺ (Britt. Rob. x10: je 0,4 M PO_4^{3-} 0,4 M BO_3^{3-} und 0,4 M CH_3COO^-)
- ▲ 0,40 M Na⁺ (1 M Na-Citrat)
- 0,06 M Na⁺ (Britt. Rob. x1: je 0,04 M der o.a. Säuren)
- 0,01 M Na⁺ (14,9 mM Na-Citrat)

Abb.50. Einfluß der Konzentration an Na^+ -Ionen auf die Aufnahme von α -Chymotrypsin vom Träger 19 in 12 Minuten



Bedingungen bei den Immobilisierungsreaktionen: s. Abbildung 49

nen: So ist bei einer kleinen Ionenstärke die Enzymaufnahme nach 30 Minuten schon fast beendet und nach 36 Minuten hatte der Träger etwa 500 mg Enzym je Gramm aufgenommen. Wurde der Träger nach einer kurzen Umsetzungszeit ausgiebig mit einer einmolaren Natriumchloridlösung gewaschen, so wurde beobachtet, daß sich dann das Enzym vom Träger auswaschen ließ und somit noch nicht kovalent gebunden war. Nach einer halbstündigen Reaktion des Trägers mit dem aufgenommenen Enzym ließ sich kein Enzym mehr abwaschen. Das bedeutet, daß das Enzym nach dieser Zeit bereits kovalent gebunden war.

Auch Polymere auf der Basis von Maleinsäureanhydrid, die entweder überhaupt nicht oder mit anderen Substanzen als Methylol-derivaten verestert worden waren, zeigten oft eine schnelle

Aufnahme von Enzym. Dieses konnte aber mit Elektrolytlösungen völlig ausgewaschen werden.

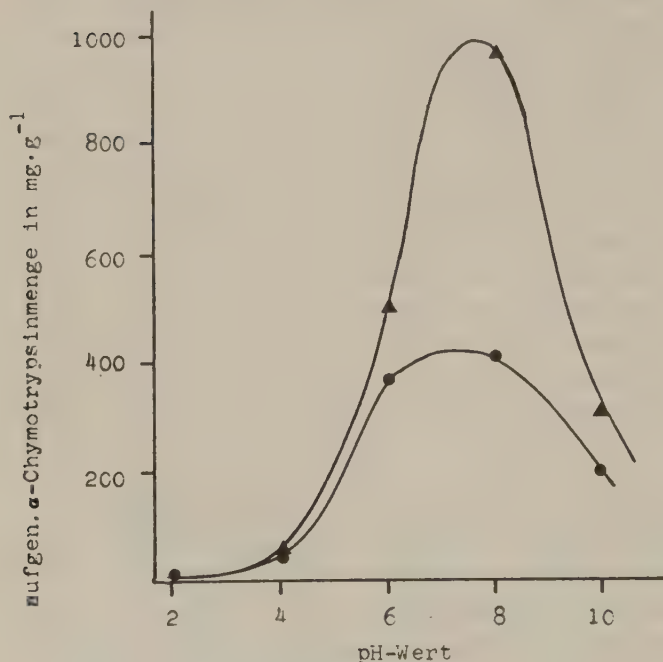
Diese Beobachtungen zeigten, daß das Enzym zunächst ionisch vom Träger gebunden wurde. Bei den Trägern, die durch Veresterung mit N-Methylolverbindungen dargestellt worden sind, folgte auf diese ionische Adsorption eine langsamere kovalente Bindung, wobei das Enzym wahrscheinlich über eine Amidgruppierung an dem Träger gebunden wurde. Die ionische Bindung des Enzyms an der Oberfläche der reaktiven Träger erhöht dort die Konzentration des Enzyms und fördert damit die Ausbildung der kovalenten Bindung. Wegen dieser ionischen Bindung wird die Immobilisierung von Enzymen mit hohem isoionischen pH-Wert zu besonders hoher immobilisierter Enzymmenge führen, da ein solches Enzymmolekül viele positiv geladene Gruppen trägt und der reaktive Träger viele negativ geladene Carboxylatgruppen aufweist.

3.3.4.2. Einfluß des pH-Wertes auf die Enzymaufnahme

Bei den hier verwendeten Puffersystemen erhöhte sich mit steigendem pH-Wert auch die Ionenstärke in den Lösungen.

Die Aufnahme des α -Chymotrypsins durch den Träger 19 wurde hier bei verschiedenen pH-Werten (Puffer: Titrisol, Merck) innerhalb von sechs und innerhalb von zwölf Minuten verfolgt (Abbildung 51). Es zeigte sich, daß die höchste Enzymmenge bei pH 8 aufgenommen wurde. Eine Verdoppelung der Zeit führte auch zu einer doppelt so hohen aufgenommenen Enzymmenge, ein Zeichen dafür, daß die Aufnahme des Enzyms sicherlich auch nach zwölf Minuten noch nicht abgeschlossen war. Trotz höherer Ionenstärke wurde also bis pH 8 bei höheren pH-Werten mehr α -Chymotrypsin aufgenommen, als bei kleinen pH-Werten. Dies wird darauf zurückzuführen sein, daß vor allem die Quellung des Trägers bei höheren pH-Werten zunimmt. Oberhalb pH 8 kann ein Rückgang der aufgenommenen Menge an α -Chymotrypsin verzeichnet werden, was durch Überschreitung des isoionischen pH-Wertes des Enzyms und die Zunahme an anionischen Gruppen am Enzym erklärbar ist. Diese bewirken eine Abstoßung des Enzyms vom anionischen Träger.

Abb.51. Einfluß des pH-Wertes auf die Aufnahme von α -Chymotrypsin durch den Träger 19 innerhalb von sechs und zwölf Minuten



Bedingungen bei der Enzymaufnahme:

Je etwa 50 mg Träger 19 wurden mit etwa 77 mg α -Chymotrypsin in 10,0 cm³ Puffer (Titrisol, Merck) bei 22°C umgesetzt. Die aufgenommenen Enzymmengen wurden bei 278 nm in einer Durchflußküvette (d=0,100 cm) bestimmt.

3.3.4.3. Untersuchung der Hydrolyse der reaktiven Träger

Um eine Entscheidung fällen zu können, ob die Immobilisierung über aktive N-Methylolester oder über noch am Polymeren verbliebene Carbonsäureanhydridgruppen erfolgte, wurden zunächst dem polymeren Ester entsprechende Modellsubstanzen aus Bernsteinsäureanhydrid und Maleinsäureanhydrid einerseits und N-Methylolsuccinimid und N-Methylolmaleinimid andererseits dargestellt. Unter den Immobilisierungsbedingungen war jedoch keine Reaktion mit Aminosäuren oder mit α -Chymotrypsin nachzuweisen. Lediglich eine Hydrolyse zum N-Methylolderivat und zur freien Carbonsäure konnte beobachtet und bei verschiedenen pH-Werten

quantitativ vermessen werden. Die Hydrolyse des Esters aus N-Methylolmaleinimid und polymerem Anhydrid wurde auch bei den reaktiven Polymeren festgestellt. So setzte ein Gramm des Trägers 18 bei 22°C in vier Stunden in 15,9 mM Citratpuffer vom pH 6,0 43 μMol N-Methylolmaleinimid zeitlinear frei. Die vollständige Hydrolyse des reaktiven Trägers dauerte bei diesem pH jedoch sehr lange. Noch nach mehrtägiger Lagerung des Trägers in Pufferlösung konnte Enzym am Polymeren immobilisiert werden. Bei pH 10 war die Hydrolyse des Trägers allerdings nach fünf Stunden abgeschlossen, nach dieser Zeit wurde auch keine Zunahme der Quellung des Trägers mehr beobachtet, jetzt erfolgte auch keine Immobilisierung von Enzym an dem Träger mehr. Wegen der leichten Hydrolysierbarkeit der Estergruppen des Trägers war eine Hydrolyse möglicher, noch am Träger vorhandener Anhydridgruppen getrennt schwer zu untersuchen.

Die zu den Estergruppen des Trägers gehörenden Banden im Infrarotspektrum bei 835 cm^{-1} und 700 cm^{-1} waren nach der Hydrolyse des Trägers verschwunden und die Polymeren ergaben mit Cystein und Natronlauge keine Färbung mehr. Eine vollständige Hydrolyse des Trägers wurde auch durch sehr kurze Einwirkung (etwa 20 Sekunden) von 1 M Natronlauge auf das Polymere erhalten.

Da thiolierte Enzyme langsamer und in geringerer Menge von diesen Trägern immobilisiert wurden, als nicht-thiolierte Enzyme, wurde vermutet, daß die Immobilisierungsreaktion vor allem dadurch erfolgte, daß sich mit den Trägern über die Aminogruppen der Enzyme Amide bildeten. Dies konnte dadurch bestätigt werden, daß Träger 19 in der Lage war, BAEE zu binden. Diese Reaktion des BAEE wurde ebenfalls optisch in einer Durchflußküvette bei 227 nm, pH 6,0 und bei 22°C in 20,0 cm^3 Lösung verfolgt. An 52,16 mg Träger 19 konnten in nur einer Minute aus 35,66 mg BAEE etwa 12 mg je Gramm Träger, also 35 $\mu\text{Mol} \cdot \text{g}^{-1}$ gebunden werden.

Auch die hohe Immobilisierungsausbeute von 96,6 Prozent bei der Immobilisierung von Lysozym an dem Träger 19 deutete auf Immobilisierung über NH_2 -Gruppen hin. Lysozym weist einen gegenüber α -Chymotrypsin wesentlich höheren isoelektrischen pH-Wert auf. Dies ist auf die größere Anzahl der vorhandenen Ar-

gininreste im Enzymmolekül zurückzuführen (11 Arg je Lysozym s.Tabelle 14).Die kovalente Verknüpfung von Enzym und Träger scheint also vor allem über eine Amidgruppe zu erfolgen.Sie kann aus einer Aminogruppe des Enzyms und entweder einer Anhydridgruppe oder einer Estergruppe (aus einem N-Methylolderivat) gebildet worden sein.Dabei war es gleichgültig,ob der Träger Estergruppen,gebildet aus N-Methylol-^h-nitrobenzoesäureamid,N-Methylolpropionsäureamid,N-Methylolpyrrolidon(2),N-Methylol-3,6-endoxa-^h-4-tetrahydrophthalimid,N-Methylolsuccinimid oder N-Methylolmaleinimid und den Carboxylgruppen aufwies.Da die reaktiven Träger durch Umsetzung von Anhydridgruppen mit den Methylolderivaten gebildet wurden,enthielten sie in der Nachbarschaft der Methylol-ester Carboxylgruppen.Eine anchimere Unterstützung der Hydrolyse der Estergruppen durch die basischen COO⁻-Nachbargruppen könnte in Anwesenheit von Aminen zu Amidgruppen führen⁶⁸.Dabei könnte intermediär eine Anhydridgruppe entstanden sein.

3.3.4.4. Immobilisierung verschiedener Enzyme

Enzyme,die verschieden hohe Anteile basischer Aminosäuren im Molekül enthalten,sich also in ihren isoionischen pH-Werten unterscheiden,werden sicherlich in verschieden hoher Menge und Geschwindigkeit vom Träger aufgenommen und immobilisiert werden.Die Immobilisierungsreaktionen mit α -Chymotrypsin, thio-lyliertem α -Chymotrypsin (tC 23),Lysozym,Trypsin,Ribonuclease und Katalase wurden in vier Stunden bei 22°C ausgeführt. Bei einem durch Britton-Robinson-Puffer eingestellten pH-Wert von 6,2 wurden je etwa 50 mg des Trägers 18 mit Enzymmengen zwischen 16,8 mg und 20,0 mg umgesetzt (Enzymkonzentration 1.5 Prozent).Die immobilisierten Enzymmengen wurden nach dem Auswaschen des nicht immobilisierten Enzyms mit 1 M NaCl-Lösung nach Folin-Ciocalteu bestimmt.Sie sind in Tabelle 33 zusammengefaßt.

Die immobilisierten Enzymmengen sind mit Ausnahme des Trypsins direkt mit den isoionischen pH-Werten der Enzyme korrelierbar. So wird vom Lysozym mit dem höchsten isoionischen pH auch am meisten am Träger 18 immobilisiert.

Tab.33. Immobilisierung verschiedener Enzyme am Träger 18

Enzym	isoelektrischer pH-Wert	gebundene Enzymmenge(mg·g ⁻¹)
Katalase	5,4	89,6
thiol.α-Chymotryps.	---	217,3
α-Chymotrypsin	8,0	282,7
Ribonuclease	9,6	301,7
Trypsin	10,1	88,5
Lysozym	11,1	379,5

Bedingungen bei den Immobilisierungsreaktionen:

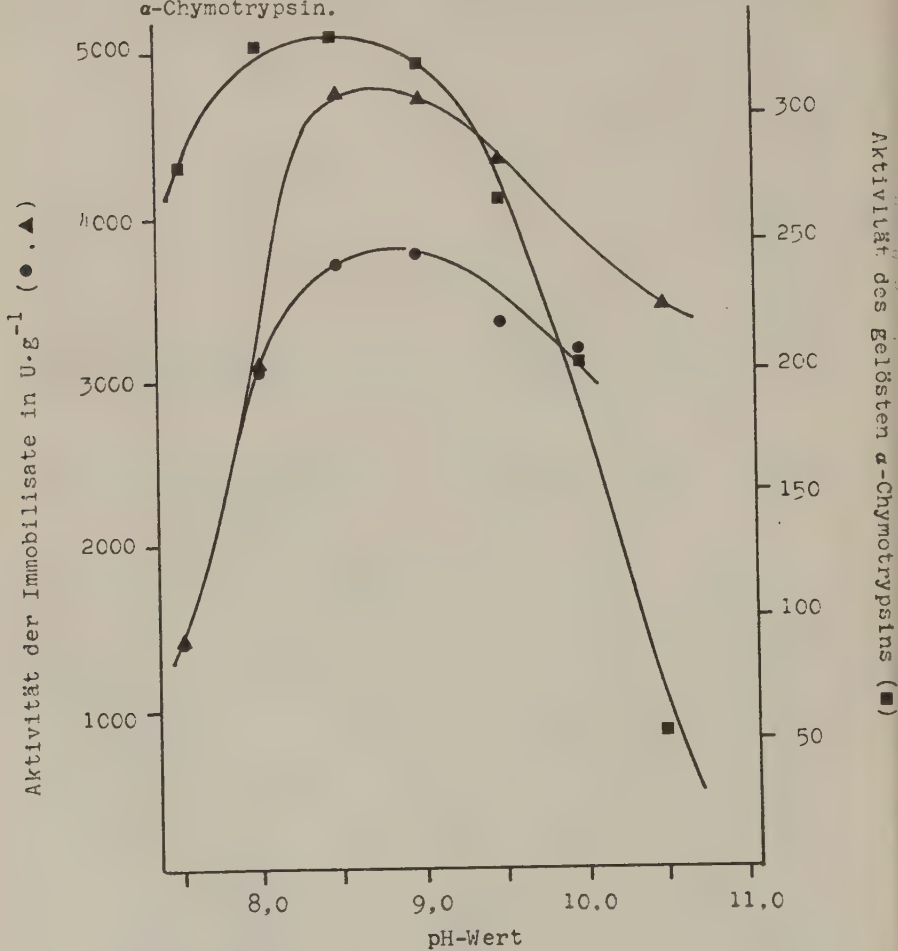
Je etwa 50 mg Träger 18 und eine 1,5-prozentige Enzymlösung in Britton-Robinson-Puffer pH 6,2 wurden bei 22°C vier Stunden durchmischt. Die gebundenen Enzymmengen wurden nach Folin-Ciocalteu bestimmt.

3.3.4.5. Charakterisierung der Immobilisate aus polymeren Anhydriden und N-Methylolverbindungen

Die Immobilisate, die aus den Trägern auf Basis von polymeren Anhydriden und N-Methylolverbindungen dargestellt wurden, übertrafen alle anderen hier zuvor beschriebenen Immobilisate an Aktivität und immobilisierter Enzymmenge. So konnte an keinen der anderen Träger unter üblichen Immobilisierungsbedingungen bis zu 1000 mg Enzym je Gramm Träger immobilisiert werden, auch konnte in keinem Fall eine Aktivität der Immobilisate aus α-Chymotrypsin von bis zu 9138 U·g⁻¹ erreicht werden.

Bei vielen Versuchen, solche Träger auch durch Veresterung mit anderen N-Methylolverbindungen darzustellen, zeigte es sich, daß N-Methylolmaleinimid und N-Methylolsuccinimid am besten geeignet waren. Die Immobilisate aller reaktiven Träger waren sehr stabil. Als Beispiel soll hier ein Immobilisat von α-Chymotrypsin am Träger 18 aufgeführt werden. Der Träger hatte 282,7 mg des Enzyms je Gramm gebunden, woraus bei einer relativen Aktivität von 3,71 Prozent eine Harzaktivität von 3134 U·g⁻¹ resultierte. Nach zweiwöchiger Lagerung bei Raumtemperatur (im Mittel 23°C) in Puffer pH 8,5 (TRIS-HCl 0.21 M, 2,10 M an NaCl) zeigte dieses Immobilisat sogar mit 4320 U·g⁻¹ eine, wohl durch erst jetzt beendete Quellung hervorgerufene, höhere Akti-

Abb. 52. pH-Profile der Aktivität von zwei α -Chymotrypsin-Immobilisaten an den Trägern 19 und 20 und von gelöstem α -Chymotrypsin.



Aktivitätsmessung:

pH-statische Titration bei 25°C und pH 8,5 mit 1 M Natronlauge in 21 cm³ 0,020 M ATEE-Lösung (0,020 M an TRIS-HCl und 0,200 M an NaCl)

- ▲: Immobilisat aus Träger 19
- : Immobilisat aus Träger 20
- : gelöstes α -Chymotrypsin

vität, als direkt nach der Immobilisierungsreaktion.

Trotz hoher Aktivität der Immobilisate und ionischer Harzmatrix konnten keine wesentlichen pH-Verschiebungen der Aktivitätswerte beobachtet werden (Abbildung 52) : Zwei aus den Trägern 19 und 20 unter gleichen Bedingungen (pH 5,8 22°C, vierstündige Reaktion, α -Chymotrypsinkonzentration 1,5 Prozent) entstandene Immobilisate sind hier stellvertretend für andere untersucht worden. Zwar sind die erhaltenen Profile deutlich breiter, als beim löslichen Enzym und auch zu höheren pH-Werten hin unsymmetrisch, das Maximum der Aktivitäten wurde aber dennoch im Bereich zwischen pH 8,5 und 8,7 erreicht.

4. Experimenteller Teil

Die in dieser Arbeit angeführten elementaranalytischen Daten wurden im Institut für Organische Chemie der Freien Universität Berlin mit einem Perkin-Elmer Analyzer 240 gewonnen. Dort wurden auch die NMR-Spektren mit einem Perkin-Elmer XL 100 aufgezeichnet.

Infrarotspektren stammten von einem Perkin-Elmer IR-Spektrophotometer 237, Spektren im ultravioletten und sichtbaren Bereich wurden mit einem Beckman DB Spektrophotometer gemessen. Dieses Gerät wurde auch als Detektor bei der Gelfiltration oder bei der Chromatografie verwendet und bei der Bestimmung der Aktivitäten von Katalase und Lysozym und deren Immobilisaten.

Schmelzpunkte wurden auf einem Kofler-Schmelzpunktapparat ermittelt und sind unkorrigiert. Brechungsindizes stammten von einem Zeiss-Refraktometer. Die pH-Werte von Pufferlösungen wurden mit einer Russel-Einstabmesskette CWL gemessen und von einem Knick-Präzisions-pH-Meter pH 34 angezeigt. Der Aufbau zur pH-statischen Messung der Enzymaktivitäten bestand aus einem pH-Stat (Eigenkonstruktion), der einen Metrohm-Dosimaten 655 steuerte; der pH-Wert wurde hier mit einer Kombination aus einer Ingold-Glaselektrode (Ag/AgCl, pH 7,0) und einer Ingold-Kalomel-Elektrode bestimmt. Die Kalomel-Elektrode war über eine Salzbrücke mit der zu vermessenden Lösung verbunden (KCl gesättigt). Die aus dem Dosimaten zudosierte Menge an Säure oder Lauge wurde mit einem Matrixdrucker (Eigenkonstruktion) ausgedruckt.

Der bei der Messung der Katalaseaktivität verwendete Absorptiostat war ebenfalls eine Eigenkonstruktion, welche vom Beckman-Photometer gesteuert, den Dosimaten zur Peroxidabgabe veranlaßte. Die Größe der Abweichung des eingestellten Transmissionswertes von gemessenen Transmissionswert bestimmte dabei die Anzahl der je Zeiteinheit an den Dosimaten abgegebenen Impulse und somit die Geschwindigkeit der Substratzugabe.

Die Messungen der Harzgrößenverteilung wurden mit einem HIAC-Particle-Size-Analyzer durchgeführt.

Säulen und die stationären Phasen zur Gelfiltration stammten von Pharmacia, gekühlt wurde mit einem Haake-Kryostat, zum

Pumpen von Flüssigkeiten wurde eine peristaltischen Pumpe von LKB verwendet, bei der Bestimmung der Katalaseaktivitäten eine modifizierte Kreislumpumpe nach Desaga.

Die verwendeten Enzyme stammten von folgenden Lieferanten:

α -Chymotrypsin	(E.C.3.4.21.1.)	Boehringer Mannheim Nr.103314
		Sigma Chemie Nr. C-4129
Katalase	(E.C.1.11.1.6.)	Boehringer Mannheim Nr.106828
Lysozym	(E.C.3.2.1.17.)	Sigma Chemie Nr. L-6876
Papain	(E.C.3.4.22.2.)	Merck Artikel 7144
Ribonuclease A	(E.C.3.1.21.4.)	Sigma Chemie Nr. R-4875
Trypsin	(E.C.3.4.21.4.)	Boehringer Mannheim Nr.109827
Urease	(E.C.3.5.1.5.)	Boehringer Mannheim Nr.127442

Als Substrate wurden folgende Substanzen bezogen:

N ^{α} -Benzoyl-L-argininethylesterhydrochlorid (BAEE)	Merck
	Art.1672
N-Acetyl-L-tyrosinethylester-hydrat (ATEE)	Merck Art.83
Cytidin-2',3'-cyclophosphat Bariumsalz	Merck Art.24531
Micrococcus Lysodeicticus	Sigma Nr.M-0128
Harnstoff	Merck Art.8488

Weitere, für biochemische Zwecke verwendete Chemikalien waren:

N-Acetyl-D,L-homocysteinethiolacton (AHTL)	Sigma Nr.A-9375
Bis-(4-nitrophenyl)-disulfid-3,3'-dicarbon-	
säure	Ega D21,820-0
Folin's Phenolreagenz	Merck Art. 9C01

Der verwendete Poly(vinylalkohol) wurde von Merck-Schuchardt bezogen (Art.821038). Asymmetrische Membranen zur Ultrafiltration (46 mm Durchmesser, Ausschlussgrenze 10000 g.Mol⁻¹) stammten von Berghof AG.

Alle anderen verwendeten Substanzen besaßen mindestens den Reinheitsgrad "zur Analyse". Das verwendete Wasser war vor der Verwendung destilliert worden. Zur Gelfiltration oder beim Arbeiten mit oxidationsempfindlichen Stoffen sowie zum Herstellen basischer Lösungen war dieses Wasser unter Stickstoff ausgekocht worden und nach dem Abkühlen im Vakuum entgast worden.

4.1. Darstellung der Monomeren

4.1.1. Maleinimid⁴⁸

In einem Rundkolben (Volumen 4 dm³) wurden bei etwa 50°C in 1000 cm³ 96-prozentiger Essigsäure 1000 g Maleinsäureanhydrid und 600 g Harnstoff gelöst. Die Lösung wurde etwa zehn Stunden auf 50°C gehalten, nach einer leicht exothermen etwa einstündigen Anfangsphase, bei der 70°C erreicht wurden. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wurde noch fünf Stunden stengelassen und dann die ausgefallene N-Carbamylmaleinsäure abgesaugt und mit etwa 200 cm³ Essigsäure gewaschen und im Vakuumtrockenschrank bei 50°C über mehrmals erneuertem festem Natriumhydroxid von der Essigsäure befreit. 1400 g reinweißes Pulver (87,5 Prozent der theoretisch möglichen Ausbeute).

Die Carbamylmaleinsäure wurde in einem Dreihalskolben (Volumen 4 dm³) mit Thermometer und KPG-Rührer in 2800 g zuvor auf 95°C erhitztem Essigsäureanhydrid suspendiert. Innerhalb von 30 Minuten ging der größte Teil in Lösung. Nach etwa 45 Minuten wurde die heiße Lösung durch ein Faltenfilter filtriert und das klare Filtrat im Wasserbad abgekühlt. Das Produkt, N-Carbamylmaleinimid, kristallisierte dabei aus der braunen Lösung aus. Es wurde etwa zwei Stunden später abgesaugt, mit wenig (150 cm³) Aceton gewaschen und über Kaliumhydroxid (Wassergehalt etwa 15 Prozent) im Vakuum bei 50°C getrocknet. 730 g hellbraune Kristalle (58,8 Proz. d. Th.)

1000 g N,N-Dimethylformamid wurden unter Rühren mit einem KPG-Rührer in einem 2-dm³-Drehalskolben mit einer Pilzheizhaube auf etwa 100°C gebracht. Dazu wurde auf einmal das N-Carbamylmaleinimid gegeben. Dabei fiel die Temperatur zunächst um anschließend bis 120°C anzusteigen. Sie wurde zwei Stunden bei 110°C gehalten, danach wurde die Heizung abgeschaltet und der Reaktionsansatz etwa 16 Stunden stengelassen. Die Lösung wurde dann durch eine Glasfilternutsche gesaugt und am Rotationsverdampfer eingeengt. Der viskose bräunliche Rückstand wurde dann schnell im Vakuum bei 5 mbar über offener Flamme so destilliert, daß nur die Vorlage mit Eiswasser gekühlt wurde, und durch den Kühler Preßluft geblasen wurde, um ein Erstarren im Kühler zu vermeiden. 264 g weißes Maleinimid mit einem geringen Gehalt an N,N-Dimethylformamid wurde erhalten. Das

Maleinimid wurde aus trockenem Essigsäureethylester umkristallisiert. 238 g (47,0 Prozent d.Th.)

4.1.2. N-Methylolmaleinimid⁴⁵

20 g Maleinimid wurden bei Raumtemperatur mit 20 g 37-prozentiger Formalinlösung übergossen, wobei unter Abkühlung ein Teil des Imids in Lösung ging. Zusatz von zwei bis drei Tropfen 5 M NaOH-Lösung bewirkte vorübergehende Rotfärbung und völlige Lösung des Imids mit darauffolgender leichter Erwärmung der Lösung. Etwa zehn Minuten später wuchsen erste Kristalle des N-Methylolmaleinimids aus der Lösung. Nach etwa einer Stunde wurde abgesaugt, mit ganz wenig Wasser abgespült und über Nacht im Vakuumexsiccator über wasserfreiem Calciumchlorid getrocknet. Das N-Methylolmaleinimid wurde dann aus heißen Essigsäureethylester umkristallisiert, im Filter blieb eine kleine Menge amorpher rötlicher Substanz ungelöst zurück. 18,0 g. (68,7 Proz. d.Th.)

4.1.3. Bis(maleinimidomethylether)

In einem zylindrischen Gefäß (Innendurchmesser 2,8 cm) wurden 15 cm³ konzentrierte Schwefelsäure auf 0°C mit Eis gekühlt. Unter intensivem Rühren wurden 2,54 g N-Methylolmaleinimid eingetragen. Nach einer Stunde wurde auf Eis gegossen und dann dreimal mit je 20 cm³ Chloroform extrahiert. Nach dem Trocknen der Chloroformphase über Natriumsulfat wurde das Chloroform am Rotationsverdampfer abgezogen und der Rückstand aus Toluol umkristallisiert. 1,50g (63,6 Prozent d.Th.) Schmp.: 133°C (Lit.⁴⁵: 130-131°C)

C ₁₀ H ₈ N ₂ O ₅ (236,18)	Ber. C 50,86	H 3,41	N 11,86
	Gef. C 50,04	H 3,44	N 11,41

4.1.4. N-Ethoxycarbonylmaleinimid⁹⁶

In einem 250 cm³-Rundkolben mit Magnetrührstäbchen und einem aufgesetzten Tropftrichter, der durch ein CaCl₂-Rohr verschlossen war, wurden 19,4 g Maleinimid und 21,0 g N-Methylmorpholin in 100 cm³ Essigsäureethylester bei 0°C gerührt. Zu dieser Mischung wurden langsam unter Rühren bei 0°C 22g Chlorameisensäureethylester getropft. Der weiße Niederschlag wurde nach 30 Minuten abgesaugt, die rötliche Lösung am Rotationsverdampfer eingeeengt und zunächst aus Toluol umkristallisiert, dann aus Diisopropylether. Farblose Kristalle. 17,0g (50,3 Proz. d.Th.) Schmp.: 60°C (Lit. 58-59°C)

4.1.5. Maleinsäureamide

Gleiche molare Mengen von Maleinsäureanhydrid und Amin, gelöst in Diethylether, Aceton oder 100-prozentiger Essigsäure wurden unter Kühlung und gutem Rühren vereinigt, so, daß die Lösung des jeweiligenamins zur Lösung des Anhydrids getropft wurde. Nach beendeter Reaktion (maximal nach fünf Stunden) wurde das ausgefallene Reaktionsprodukt abgesaugt, mit dem betreffenden Lösungsmittel gewaschen und im Vakuum getrocknet. Die Ausbeuten lagen zwischen 95 und 98 Prozent der theoretisch möglichen Mengen.

Amin	Lösungsmittel	Schmp. (°C)	Elementaranalyse		
			C	H	N
2-Aminoacetaldehyd- dimethylacetal	Diethylether	111 Ber.	47,29	6,45	6,89
			Gef. 47,04	6,55	6,61
2-Aminoacetaldehyd- diethylacetal	Diethylether	97 Ber.	51,94	7,41	6,06
			Gef. 51,69	7,55	6,18
Glycin	Essigsäure	182 Ber. (Z)	41,63	4,08	8,09
			Gef. 39,79	4,69	9,24
3-Aminopropion- säure	Essigsäure	167 Ber.	44,92	4,85	7,48
			Gef. 44,40	4,70	7,42
4-Aminobutter- säure	Essigsäure	161 Ber.	47,76	5,51	6,96
			Gef. 47,58	5,65	6,89
6-Aminohexansäure	Essigsäure	167 Ber.	52,40	6,60	6,11
			Gef. 52,04	6,80	6,07
4-Aminobenzoesäure	Essigsäure	230 Ber. (Z)	56,17	3,86	5,96
			Gef. 56,19	4,16	6,24

4.1.6. Maleinimidderivate durch Wasserabspaltung mit Essigsäureanhydrid

Die gewünschte Menge Maleinsäureamid wurde in der doppelten Gewichtsmenge Essigsäureanhydrid suspendiert, der Suspension 1,0 g Natriumacetat zugesetzt und unter Rühren im offenen Rundkolben schnell auf 80°C bis 100°C erwärmt. In etwa 15 Minuten ging das Amid in Lösung. Nach weiteren 30 Minuten wurde unter Wasser abgekühlt und die etwa vierfache Menge des Volumens an Wasser zugesetzt. Nach der vollständigen Hydrolyse des Essigsäureanhydrids wurden feste wasserunlösliche Maleinimidderivate abgesaugt, mit Wasser gewaschen, über Calciumchlorid getrocknet und anschließend aus geeigneten Lösungs-

mitteln umkristallisiert. Alle anderen wurden mit Chloroform aus der bräunlichen Lösung extrahiert, die Chloroformphase über Natriumsulfat getrocknet und nach dem Abziehen des Chloroforms am Rotationsverdampfer flüssige Derivate durch Kugelrohrdestillation gereinigt und feste durch Umkristallisieren aus einem geeigneten Lösungsmittel.

Maleinimidderivat	Schmp. (°C) Sdp. (°C)	Ausbeute (%)	n_D^{25}	Lm.	Elementaranalyse		
					C	H	N
2-Maleinimidoacet-	---	72,4	1,4754	---	Ber. 51,89	5,99	7,56
aldehyddimethylace-	91 _{1,0} ⁰				Gef. 51,41	6,20	7,42
tal							
2-Maleinimidoacet-	---	75,6	1,4587	---	Ber. 56,33	7,09	6,57
aldehyddiethylace-	150 _{0,1} ⁰				Gef. 55,87	7,69	6,46
tal							
3-Maleinimidopro-	106 ₁₅₀ ⁰ _{0,4}	27,3	---	Benzol	Ber. 49,71	4,17	8,28
pionsäure					Gef. 49,62	4,67	7,93
4-Maleinimidoben-	234 ⁰	89,8	---	Wasser	Ber. 60,83	3,25	6,45
zoesäure	---				Gef. 60,29	3,69	6,17

4.1.7. Maleinimidderivate aus N-Ethoxycarbonylmaleinimid und Aminen⁹⁶

0,02 Mol des betreffenden Amins und 0,02 Mol (3,38 g) N-Ethoxycarbonylmaleinimid wurden bei 0°C in 50 cm³ gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung gelöst. Nach zehn Minuten wurde mit 250 cm³ kaltem Wasser verdünnt und dann eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Die Lösung wurde mit konzentrierter Schwefelsäure auf etwa pH 6 eingestellt, am Rotationsverdampfer auf etwa 50 cm³ eingengt und dann mit 1 M Schwefelsäure auf pH 1...2 gebracht. Es wurde danach dreimal mit 80 cm³ Chloroform extrahiert, die Chloroformphase mit Natriumsulfat getrocknet und das Chloroform abgezogen. Die Substanzen wurden aus Essigsäureethylester umkristallisiert.

Maleinimidderivat	Ausbeute (%)	Schmp. (°C)	Elementaranalyse		
			C	H	N
3-Maleinimidopropion-	66,3	86	Ber. 49,71	4,17	8,28
säure		(Lit. 89-90)	Gef. 50,04	4,32	8,35
4-Maleinimidobutter-	46,8	92	Ber. 52,46	4,95	7,65
säure			Gef. 52,13	5,01	7,53
6-Maleinimidohexan-	58,9	107	Ber. 56,87	6,20	6,63
säure		(Lit. 107)	Gef. 56,50	6,16	6,94

4.1.8. Veresterung von Maleinimidocarbonsäuren

10 mMol der Maleinimidocarbonsäure und 10 mMol (1,15 g) N-Hydroxysuccinimid wurden unter Feuchtigkeitsausschluß bei 0°C zu 25 cm³ trockenem Essigsäureethylester gegeben. Unter Rühren wurde eine Lösung von 11 mMol (2,27 g) Dicyclohexylcarbodiimid in 10 cm³ Essigsäureethylester langsam zugetropft. Nach einer weiteren Stunde Rühren bei 0°C wurde über Nacht (15 Stunden) bei Raumtemperatur stengelassen. Das Reaktionsgemisch wurde dann durch eine Sinterglasfritte gesaugt und so vom ungelösten Dicyclohexylharnstoff befreit, dann wurde bis zur Trockene eingengt und aus einem geeigneten Lösungsmittel umkristallisiert.

Ester	Ausbeute (%)	Schmp. (°C)	Lösungsm.	Elementaranalyse		
				C	H	N
N-Succinimidyl-4-maleinimidobenzoat	78,9	198	Ethanol	Ber. 57,33 Gef. 57,42	3,21 3,94	8,91 8,83
N-Succinimidyl-3-maleinimidopropionat	65,3	158	Essigsäure-ethyl-ester	Ber. 49,63 Gef. 50,68	3,79 4,32	10,52 10,52
N-Succinimidyl-4-maleinimidobutyrat	68,5	117	Toluol	Ber. 51,43 Gef. 50,92	4,32 5,30	10,00 9,99

4.1.9. N-(Imidomethyl)-carboxamidoalkane²⁴

Unter starkem Rühren und sorgfältiger Temperaturkontrolle wurden bei 0°C in 25 cm³ konzentrierte Schwefelsäure 20 mMol der N-Methylolverbindung und 20 mMol eines Nitrils abwechselnd in kleinen Portionen eingetragen. Anschließend wurde noch zwei Stunden bei 0°C gerührt und die Mischung dann auf Eis gegossen. Unlösliche Reaktionsprodukte wurden dann abgesaugt und lösliche mit Essigester extrahiert, die nichtwässrige Phase mit Natriumsulfat getrocknet und der Essigsäureethylester abgezogen. Die festen Reaktionsprodukte wurden aus Ethanol umkristallisiert. Farblose Kristalle.

Derivat	Ausbeute Schmp.Lösungsmittel		Elementaranalyse			
	(%)	(°C)	C	H	N	Br
N-(Maleinimidomethyl)- carboxamidopropan	80,2	131	Toluol Ber.52,74 Gef.52,58	5,53 5,46	15,38 15,33	-- --
N-(Maleinimidomethyl)- carboxamido-3-brom- propan	87,2	155	Ethanol Ber.36,79 Gef.36,71	3,47 3,45	10,73 10,67	30,63 30,49
N-(Succinimidomethyl)- carboxamido-3-brom- propan	85,3	116	Ethanol Ber.36,52 Gef.36,23	4,21 4,32	10,65 10,04	30,37 30,05

4.1.10. Hydroxymethylester von Dicarbonsäuren

20 mMol der N-Methylolverbindung, 20 mMol Carbonsäureanhydrid und 20 mMol (2,02 g) N-Methylmorpholin wurden in 70 cm³ trockenem Essigsäureethylester bei Raumtemperatur zehn Stunden gerührt. Zur Reaktionsmischung wurde dann 50 cm³ Wasser und 10 cm³ konzentrierte Salzsäure gegeben, die organische Phase abgetrennt und die wäßrige Phase noch zweimal mit je 50 cm³ Essigsäureethylester extrahiert. Der nach Trocknen und Abziehen des Lösungsmittels verbliebene Ester wurde anschließend aus Essigsäureethylester umkristallisiert.

N-Methylolderivat	Anhydrid	Ausbeute Schmp.		Elementaranalyse		
		(%)	(°C)	C	H	N
N-Methylolmaleinimid	Bernsteinsäureanhydrid	88,3	99-101	Ber.47,58 Gef.46,43	3,99 3,91	6,17 5,94
N-Methylolsuccinimid	Bernsteinsäureanhydrid	80,5	138	Ber.47,17 Gef.47,53	4,84 4,88	6,11 6,14
N-Methylolsuccinimid	Maleinsäureanhydrid	83,7	109	Ber.47,58 Gef.47,58	3,99 3,99	6,17 6,09

4.1.11. N-Methylolsuccinimid¹¹³

38 g Succinimid wurde mit 33 g 37-prozentiger Formaldehydlösung übergossen und nach Zufügen von 0,5 g Kaliumcarbonat kurz zum Sieden erhitzt. Dann wurde die Lösung bei 50°C am Rotationsverdampfer eingeengt und abgekühlt. Nach Reiben oder Animpfen kristallisierte der Ansatz durch. Die Substanz wurde aus Ethanol umkristallisiert. 36 g farblose Kristalle (72,7 Proz.d.Th.). Schmp.66°C

$C_5H_7NO_3$ (129,12) Ber. C 46,51 H 5,46 N 10,85
 Gef. C 46,87 H 5,57 N 10,61

4.1.12. 2-Mercaptoacetaldehyddimethylacetal⁶⁵

In einem 500 cm³-Dreihalskolben mit Rührer, Tropftrichter und Innenthermometer wurden 86 g Essigsäurevinylester in 150 cm³ Tetrachlormethan vorgelegt und mit einem Eis/Wasser-Gemisch auf 0°C gekühlt. Zur Lösung wurde Brom in Tetrachlormethan getropft (51 cm³ Br₂ in 90 cm³ CCl₄), so daß die Temperatur 10°C nicht überschritt. Als sich zugegebenes Brom nicht weiter entfärbte, wurde die Lösung langsam in einem gekühlten Rundkolben überführt, der 350 cm³ Methanol enthielt und dort zwei Tage bei Raumtemperatur stengelassen. Dann wurde in 1 dm³ Wasser gegossen und die organische Phase abgetrennt. Die wäßrige Phase wurde noch zweimal mit je 150 cm³ Tetrachlormethan ausgeschüttelt, die organischen Phasen vereinigt, über Calciumchlorid getrocknet und über eine 30 cm lange Widmerkolonne bei 20 mbar fraktioniert. 126 g farblose Flüssigkeit (ca. 85 Prozent der theoretisch möglichen Ausbeute).

In einem Dreihalskolben mit einem nutzbaren Volumen von 1 dm³ mit KPG-Rührer und Rückflußkühler und Tropftrichter wurden 110 g Na₂S·9H₂O in 550 cm³ siedendem Ethanol gelöst und 28 g Schwefelpulver zugegeben. In die entstandene Lösung wurden 100 g des 2-Bromacetaldehyddimethylacetals (0,59 Mol) getropft und danach noch weitere vier Stunden gekocht. Schließlich wurden 27 g (0,32 Mol) Natriumhydrogencarbonat zugefügt und dann 500 cm³ Ethanol abdestilliert, indem der Rückflußkühler mit einer Destillationsbrücke vertauscht wurde. Die Lösung wurde dann abgekühlt und mit 300 cm³ Wasser verdünnt. Es wurde dreimal mit je 100 cm³ Diethylether extrahiert. Die vereinigten etherischen Phasen wurden dreimal mit je 50 cm³ zehnpromzentiger Natronlauge und dann in derselben Weise mit Wasser und schließlich mit gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen und anschließend über trockenem Kaliumcarbonat getrocknet. Nach Abziehen des Ethers blieb etwa 85 g einer hellgelben Flüssigkeit zurück.

39 g dieser Flüssigkeit wurden in 200 cm³ absolutem Diethylether gelöst und unter Feuchtigkeitsausschluß zu einer magnetisch gerührten Suspension von 15 g Lithiumaluminiumhydrid in ebenfalls 200 cm³ Diethylether getropft. Nach beendeter Zu-

gabe wurde noch eine Stunde am Rückfluß gekocht. Nachdem die Lösung abgekühlt worden war, wurde überschüssiges LiAlH_4 vorsichtig mit gesättigter Natriumsulfatlösung hydrolysiert. Die wäßrige Phase wurde mit halbkonzentrierter Schwefelsäure neutralisiert und dann nach Trennung von der organischen Phase noch zweimal mit 50 cm^3 Diethylether ausgeschüttelt. $26,3 \text{ g}$ schwach gelbes Öl von sehr unangenehmem Geruch konnten nach Abziehen des Ethers isoliert werden. Sdp_{17} , ca. 28°C ; Sdp_{80} ca. 81°C (Lit. Sdp_{80} : $79-80^\circ\text{C}$). $n_D^{30} = 1,4465$ (Lit.: $n_D^{30} = 1,4463$)

4.1.13. 2-Thiopyridon^{114,115}

Die verwendete Apparatur zur Darstellung von 2-Brompyridin bestand aus einem 4 dm^3 -Reaktionsgefäß mit Planschliff-Dekkel. In das Gefäß, welches zum Kühlen mit Eis/Natriumchlorid in einem großen Eimer steckte, ragte bis fast zum Boden ein KPG-Rührer mit Glasflügeln und der NTC-Fühler eines elektronischen Thermometers. Im Deckel des Gefäßes befand sich außerdem noch ein großer Tropftrichter.

1053 cm^3 48-prozentige, wäßrige Bromwasserstoffsäure ($9,33 \text{ Mol}$) wurden vorgelegt und mit Eis/ NaCl auf 10°C gebracht. Innerhalb von 15 Minuten wurden 200 g 2-Aminopyridin ($2,12 \text{ Mol}$) zugegeben. Dann wurde gewartet, bis 0°C unterschritten waren und 320 cm^3 Brom ($6,27 \text{ Mol}$) langsam zugetropft, danach 367 g Natriumnitrit ($5,33 \text{ Mol}$) in 540 cm^3 Wasser. Nach dieser Zugabe wurde noch eine Stunde gerührt und dann 800 g NaOH in 800 cm^3 Wasser so langsam zugegeben, daß trotz der stark exothermen Reaktion die Temperatur von 25°C nicht erreicht wurde. Die Farbe der Reaktionsmischung änderte sich derweil von braunrot nach schwach gelb. Die entstandene Lösung wurde mit dreimal 200 cm^3 Diethylether extrahiert, der Ether über Kaliumhydroxid getrocknet, eingengt und der Rückstand unter vermindertem Druck destilliert. Es wurden 112 g leicht gelbes 2-Brompyridin ($33,3 \text{ Proz.d.Th.}$) erhalten.

In einem 2 dm^3 -Rundkolben mit Rückflußkühler wurden 377 g 2-Brompyridin und 185 g Thioharnstoff, gelöst in 1200 cm^3 Ethanol eine Stunde unter Rühren zum Rückfluß erhitzt. Dann wurde die Heizung abgeschaltet und drei Tage lang gerührt. Die

ethanolische Lösung wurde mit 1014 cm³ 24-prozentiger Ammoniaklösung versetzt und weitere vier Tage gerührt, dabei erhielt die Lösung eine orange Farbe. Schließlich wurde das Ethanol am Rotationsverdampfer abgezogen, der Rückstand mit konzentrierter Essigsäure auf pH 4 gebracht und dreimal mit 150 cm³ Chloroform extrahiert. Nach Trocknen über Natriumsulfat, Abziehen des Lösungsmittels und Umkristallisation aus Toluol konnten 73,5 g (29,7 Proz.d.Th.) 2-Thiopyridon gewonnen werden.
Schmp.: 127°C (Lit.: 128-130°C)

4.1.14. 2,2'-Dipyridyldisulfid¹¹⁶

73,5 g 2-Thiopyridon (0,66 Mol) wurden in einem Becherglas in 300 cm³ Wasser suspendiert und in die Suspension solange festes Natriumhydroxid eingetragen, bis alles in Lösung gegangen war. 84 g Iod (0,66 Mol) und 55 g (0,33) Kaliumiodid in 200 cm³ Wasser wurden solange zugesetzt, bis gerade keine Entfärbung mehr stattfand. Der hellgelbe Feststoff wurde abgetrennt und nach dem Trocknen aus Ligroin (Siedebereich 50 bis 70°C) umkristallisiert. Es wurden 59,0 g fast farbloses Produkt isoliert.

Schmp.: 56°C (Lit.: 57-58°C)

C ₁₀ H ₈ N ₂ S ₂ (220,32)	Ber.	C 54,52	H 3,66	N 12,71	S 29,11
	Gef.	C 54,39	H 3,69	N 12,88	S 29,53

4.1.15. Methacrylsäurechlorid⁶⁶

In einem 500 cm³-Rundkolben wurden zu 86,1 g Methacrylsäure (1 Mol) 281,1 g Benzoesäurechlorid (2 Mol) gegeben und das Gemisch nach Zusatz von 0,5 g Hydrochinon destilliert, bis die Siedetemperatur 110°C erreichte. Das entstandene Methacrylsäurechlorid wurde dann über eine 30 cm-Vigreux-Kolonne gereinigt. 93 g (89,0 Proz.d.Th.) farbloses Methacrylsäurechlorid vom Siedepunkt 95°C.

4.1.16. Abtrennung von 1,4-Divinylbenzol aus dem käuflichen Isomerengemisch⁶⁷:

1 dm³ käufliches 1,4-Divinylbenzol-Isomerengemisch (Gehalt etwa 20 Prozent an 1,4-Divinylbenzol) wurde in einem 3-dm³-Becherglas mit einem KPG-Rührer gerührt und dabei mit Eis/Natriumchlorid auf 0°C gekühlt. 300 g wasserfreies, feingepulvertes Kupfer(I)chlorid wurde dann langsam zugegeben. Das Gemisch wurde gegebenenfalls mit eiskaltem Toluol verdünnt, um es rührfähig

zu halten. 30 Minuten nach der CuCl -Zugabe wurde der gelbe Cu -Komplex auf einer D3-Glasfilternutsche abgesaugt und dreimal mit je 200 cm^3 Toluol (0°C) gewaschen. Der feste gelbe Komplex wurde in einen 1 dm^3 -Rundkolben überführt, mit 500 cm^3 Toluol versetzt und auf 80°C erwärmt, dann heiß abgesaugt. Der graue Filterkuchen wurde zweimal mit 100 cm^3 heißem Toluol gewaschen und das Toluol aus dem gelblichen Filtrat am Rotationsverdampfer abgezogen. Der Rückstand wurde beim Vakuum einer Wasserstrahlpumpe destilliert. Bei etwa 95°C ging das Produkt über. Es wurde durch Abkühlen auf 0°C kristallisiert, die entstandenen Kristalle des reinen 1,4-Divinylbenzols wurden abgesaugt. Da die Substanz leicht zur Polymerisation neigt, wurde sie bei -18°C gelagert und durch Versetzen einer Substanzprobe mit Methanol vor dem Gebrauch auf eventuell gebildetes Polymer geprüft.

4.1.17. N-Succinimidyl-3-(2-pyridyldithio)-propionat^{30,62}

In einem mit CaCl_2 -Rohr gegen Feuchtigkeit abgeschlossenen Reaktionsgefäß wurden $1,85 \text{ g}$ ($8,40 \text{ mmol}$) 2,2'-Dipyridyldisulfid in trockenem Essigsäureethylester (15 cm^3) gelöst und langsam $0,93 \text{ g}$ ($8,76 \text{ mmol}$) 3-Mercaptopropionsäure in 10 cm^3 des gleichen Lösungsmittels aus einem Tropftrichter mit Druckausgleich zugegeben. Nachdem etwa ein Drittel davon zugetropft worden war, wurden zum Reaktionsgemisch noch mit einer Pipette zwei Tropfen BF_3 -Etherat gegeben. Nach beendeter Zugabe wurde noch 24 Stunden bei Raumtemperatur gerührt und anschließend das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer abgezogen. Der Rückstand wurde in Eiswasser gekühlt, mit 10 cm^3 eiskaltem Essigsäureethylester aufgenommen und durch Filtration von in Essigsäureethylester unlöslichen Anteilen befreit. $0,68 \text{ g}$ ($5,91 \text{ mmol}$) N-Hydroxysuccinimid wurden dann zugegeben und danach eine Lösung von $1,44 \text{ g}$ ($6,98 \text{ mmol}$) Dicyclohexylcarbodiimid in 10 cm^3 trockenem Essigsäureethylester langsam bei 0°C zugetropft. Nach fünfständigem Rühren wurde der Niederschlag aus Dicyclohexylharnstoff bei 0°C abgesaugt, mit etwas kaltem Essigsäureethylester nachgewaschen und dann das Lösungsmittel im Vakuum unter 40°C abgezogen. Der dunkelgelbe Rückstand wurde in wenig trockenem Chloroform aufgenommen und an Kieselgel chromatografiert. Die verwendete Säule hatte bei einem Durchmesser von $1,0 \text{ cm}$ eine Länge von 70 cm . Laufmittel war ebenfalls Chloroform.

($5 \text{ cm}^3 \cdot \text{min}^{-1}$). Das Produkt konnte zu Beginn als farblose, aus Ethanol kristallisierende Substanz gewonnen werden. Danach wurde eine kleine Menge unumgesetzten 2,2'-Dipyridyldisulfids isoliert und durch Elution mit Chloroform/Ethanol (1:1 v/v) konnte 2-Thiopyridin von der Säule gewaschen werden. Ausbeute an N-Succinimidyl-3-(2-pyridyldithio)-propionat betrug 0,95g (51,4 Prozent der theoretisch möglichen Ausbeute bezogen auf eingesetztes 2,2'-Dipyridyldisulfid).

Schmp.: 78°C (Lit.: $78,5-80,5^\circ\text{C}$)

$\text{C}_{12}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{S}_2\text{O}_4$ (312,37)	Ber. C 46,14	H 3,87	N 8,97	S 20,53
	Gef. C 44,82	H 3,82	N 8,44	S 20,65

4.2. Darstellung der Polymeren

4.2.1. Vernetzung von löslichem Poly(vinylalkohol)

In einem 3 dm^3 -Becherglas wurden zu 2 dm^3 Wasser, welches magnetisch mit einem großen Rührstab gerührt wurde, bei Raumtemperatur 44,0 g Poly(vinylalkohol) gefügt (1 Mol Hydroxylgruppen) und dann unter schnellem Rühren langsam die Temperatur auf etwa 80°C erhöht. Nach dem Erreichen dieser Temperatur wurde die Heizung abgeschaltet und unter mäßigem Rühren abgewartet, bis sich das Polymere vollständig gelöst hatte, nachdem zur heißen Lösung noch 1,34 g, 2,68 g oder 6,71 g Terephthalaldehyd gegeben worden waren. Die Vernetzung wurde gestartet, indem zur klaren abgekühlten Polymerlösung 20 cm^3 32-prozentige Salzsäure gegossen wurden. Je nach Temperatur und Vernetzermenge **erstarrte die Lösung** nach verschieden langer Reaktionsdauer, im Mittel nach etwa 30 Minuten zu einem trüben Gel. Weitere 30 Minuten später ließ sich der vernetzte Poly(vinylalkohol) von der Glaswand lösen. Das Gel wurde kurz mit einem Glasstab durchgerührt und dann noch etwa 20 Stunden magnetisch gerührt. Zu diesem Zeitpunkt hatte sich das Harz vom Wasser getrennt, so daß das körnige weiße Produkt leicht abfiltriert und mit Wasser säurefrei gewaschen werden konnte. Das Harz wurde dann durch langsam gesteigerte Methanolkonzentration im Waschwasser entquollen, durch ein grobmaschiges Sieb püriert und frei an der Luft getrocknet. Nach dem Trocknen wurde das klare, sehr harte Produkt in einer Culatti-Schlagmühle zerkleinert (Siebeinsatz 0,7 mm Lochdurchmesser) und das Mahlgut in einem Siebsatz so sepa-

riert, daß Korngrößentrennung bei 0,2 mm erfolgte: Harz mit größeren Dimensionen als 0,2 mm wurde nochmals in die Schlagmühle gefüllt und gemahlen und dann wieder separiert. Auf diese Weise blieb schließlich nur noch Polymeres zurück, welches kleiner als 0,2 mm war. Dieses wurde in ein Sieb mit einer Maschenweite von 0,10 mm überführt und unter Petroleumbenzin von Anteilen, die kleiner als 0,10 mm waren, befreit. Je nach Vernetzerzusatz wurden auch verschiedene Ausbeuten erhalten. So betrug die Menge an vernetztem Polymeren vor dem Mahlen und Sieben im Mittel noch etwa 25 g. Von dieser Menge ging gut ein Drittel bei der nachfolgenden Separationsprozedur noch verloren.

4.2.2. Radikalische Polymerisationsreaktionen

Die zur Polymerisation verwendeten Monomeren wurden kurz vor der Polymerisationsreaktion entweder durch Umkristallisieren oder durch Destillation von Verunreinigungen und vom Stabilisator befreit. Die erforderlichen Mengen der Monomeren und bei Bedarf trockenes Lösungsmittel wurden dann gemischt, die Lösung mit jeweils etwa 60 mg des Starters versetzt und in 30 cm³-Portionen in dickwandige Ampullen gefüllt (2,5 mm Wandstärke, Gesamtvolumen ca. 45 cm³) und darin mit flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Ampullen wurden dann evakuiert und unter Vakuum aufgetaut und nachdem alles flüssig geworden war, wieder eingefroren. Der Gasraum über dem Ampulleninhalt wurde dann mit Stickstoff gefüllt, dann wurde wieder evakuiert, aufgetaut, eingefroren, mit Stickstoff gespült und nach nochmaligem Evakuieren wurde die Ampulle unter Vakuum zugeschmolzen. Die Polymerisationsreaktion geschah bei 60°C in einem Ofen. Dort wurde die Ampulle drei Tage lang bei 60°C gehalten, dann geöffnet und der jetzt feste Inhalt grob zerkleinert und mit einem Lösungsmittel, in dem die eingesetzten Monomeren löslich waren, extrahiert (vorwiegend Aceton oder Dichlormethan). Nach etwa zweitägiger Extraktion mit einem Soxhlet-Extraktionsapparat wurde das Polymere getrocknet, durch Auswiegen die Polymerisationsausbeute bestimmt und dann gemahlen und gesiebt, um Harzpartikel mit Größen zwischen 0,1 mm und 0,2 mm zu erhalten.

4.2.3. Derivatisierung von Poly(vinylalkohol) mit Acetalen

4,00 g vernetzter Poly(vinylalkohol) wurden unter Rühren in 160 cm³ Wasser suspendiert und mit der gewünschten Menge des Acetals versetzt. Die Suspension wurde in einem Glycerinbad auf 45°C bis 50°C gehalten und mit etwa 2 cm³ 32-prozentiger

Salzsäure versetzt. Nach der gewünschten Reaktionsdauer wurde das Polymere auf eine Glasfilternutsche gegossen und abgesaugt. Das Harz wurde einigemal mit Wasser gewaschen, bis es säurefrei war und dann durch steigende Acetonkonzentration im Waschwasser von wasserunlöslichen Substanzen befreit. Durch dann dem Aceton in wachsenden Mengen beigefügtes Petroleumbenzin wurde das Polymere vom Aceton befreit und entquollen und schließlich durch Durchsaugen von Luft getrocknet. Die so derivatisierten Harze wurden danach auf ihre Gewichtskonstanz geprüft und eine Probe im Photometer untersucht, um sicherzustellen, daß der Waschvorgang quantitativ war.

4.2.4. Derivatisierung von Polymeren mit 1-Chlor-2,3-epoxypropan
20g Polymeres (Sephadex oder Poly(vinylalkohol)) wurden in einem offenen Erlenmeyerkolben mit 150 cm^3 1M NaOH versetzt, unter Rühren 10 cm^3 1-Chlor-2,3-epoxypropan zugegeben und dann auf 60°C in einem Wasserbad erwärmt. Nach einer Stunde wurden nochmals 5 cm^3 des Epoxids zugegeben und eine weitere Stunde bei 60°C gehalten. Das Harz wurde dann auf einer Glasfritte abgesaugt und mit Wasser neutral gewaschen, dann mit 0,5 M Phosphatpuffer pH 6,3 gewaschen, nach dem Absaugen wieder in einen Erlenmeyerkolben überführt, dort mit 70 cm^3 des gleichen Puffers versetzt und dann 50 cm^3 2 M Natriumthiosulfat dazugefügt. Das Gemisch wurde 22 Stunden bei Raumtemperatur langsam gerührt. Schließlich wurde das Harz mit Wasser auf einer Glasfritte gewaschen und dann entweder bei 4°C gelagert oder direkt weiter zum Thiol reduziert, indem zu dieser Harzmenge 60 cm^3 0,1 M Natriumhydrogencarbonatlösung und 5 cm^3 2-Mercaptoethanol gegeben wurden und zur Reduktion drei Stunden bei Raumtemperatur gerührt wurde. Das Harz wurde dann mit unter Stickstoff ausgekochtem Wasser, welches 1 mM an EDTA war, geruchfrei gewaschen. Die letzten Mengen an Waschwasser wurden zusätzlich mit DTNB kontrolliert, damit wirklich alles 2-Mercaptoethanol vom Polymeren abgewaschen wurde. Der SH-Gehalt des erhaltenen Polymeren wurde durch Titration mit DTNB und durch den per Elementaranalyse bestimmten Schwefelgehalt ermittelt.

4.2.5. Darstellung reaktiver Disulfide aus Polymeren mit Thiolgruppe

4.2.5.1. Reaktion mit 2,2'-Dipyridyldisulfid

Eine scharf abgesaugte Menge an Harz, die etwa 10 g trockenem Polymer entsprach, wurde mit 0,05 M Natriumhydrogencarbonat-

Lösung gewaschen (1mM an EDTA), die solange mit immer höheren Anteilen an Aceton verdünnt war, bis der Acetongehalt 60 Volumenprozent erreicht hatte. Das Polymere wurde zum Schluß in 50 cm³ dieser Lösung suspendiert und dann mit einer 0,3 M Lösung von 2,2'-Dipyridyldisulfid in demselben System versetzt (50 cm³). Nach zweistündigem Rühren bei Raumtemperatur wurde die Lösung abgesaugt, das Harz mit Aceton-NaHCO₃-Lösung gewaschen und dann sukzessiv der Acetonanteil im Lösungsmittel erniedrigt, bis schließlich mit 1mM EDTA in Wasser gewaschen wurde. Der Waschvorgang wurde durch Messung der Transmission der Waschlösung bei 343 nm optisch verfolgt.

4.2.5.2. Reaktion mit N-Succinimidyl-3-(2-pyridyldithio)-propionat (SPDP) (Thiolierungsreagenzien I und II)

Eine thiolgruppenhaltige Harzmenge, die etwa 10g trockenem Polymer entsprach, wurde mit 0,1 M Acetatpuffer (0,3 M an NaCl) äquilibriert und dann der Ethanolanteil in diesem Puffer stetig erhöht, bis 30 Volumenprozent erreicht waren. In 40 cm³ dieser Lösung wurde dann das Harz suspendiert und dazu eine Lösung von 2,50 g SPDP in 2,50 cm³ Ethanol gegeben. Es wurde eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt, mit dem erwähnten Puffer gewaschen und dann die Ethanolmenge gesteigert, bis schließlich nur noch Ethanol verwendet wurde. Das Harz wurde unter Ethanol bei 4°C aufbewahrt.

4.2.6. Derivatisierung der polymeren Nitrile

In einem zylindrischen Reaktionsgefäß mit Rührer wurden 15 cm³ konzentrierte Schwefelsäure im Eisbad auf 0°C gekühlt. Bei dieser Temperatur wurde ein Gemisch aus 1,00 g des polymeren Nitrils mit 2,00 g der Hydroxymethylverbindung langsam eingetragen, so daß keine wesentliche Temperaturerhöhung zu beobachten war. Die Harzsuspension wurde dann bei 0°C gerührt und nach vorbestimmter Reaktionszeit auf etwa 50 g Eis gegossen. Das Harz wurde dann säurefrei gewaschen, was in einigen Fällen einige Tage in Anspruch nahm. Nach Verdrängen des Wassers mit Aceton wurde der entstandene Träger dann getrocknet und durch Gewicht, Elementaranalyse, Titration der reaktiven Gruppen und Infrarotspektren charakterisiert.

4.2.7. Derivatisierung der polymeren Anhydride

In einem gut verschließbaren Reaktionsgefäß mit luftdicht aufgestecktem Rührer wurde 1,00 g des polymeren Anhydrids und 1,50 g der Hydroxymethylverbindung in 15 cm³ Essigsäureethylester gelöst beziehungsweise suspendiert und unter weiterem Rühren mit 6,0 cm³ trockenem, frisch destillierten N-Methylmorpholin versetzt. Unter Feuchtigkeitsausschluß wurde dann gerührt und nach dem festgelegten Ende der Reaktion das Polymere abgesaugt, dann mit Essigsäureethylester, Aceton, Wasser, verdünnter Salzsäure, Wasser, Aceton und Petroleumbenzin in dieser Reihenfolge gewaschen und durch Luftdurchsaugen bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Das so gewonnene reaktive Harz wurde durch Elementaranalyse, Infrarotspektren, Quellbarkeit und Titration reaktiver Gruppen sowie durch Zunahme des Gewichtes charakterisiert.

4.3. Reaktionen zur Modifizierung von Proteinen

4.3.1. Thiolierungsreaktionen mit N-Acetyl-D,L-homocysteinethiolacton (AHTL)⁷⁷⁻⁸².

In einem zylindrischen Reaktionsgefäß wurde bei 0°C 1000 mg des jeweiligen Enzyms in 20 cm³ 0,0625 M Natriumborat-Puffer vom pH 10,45, der bei der Thiolierung von Trypsin noch 0,01 M an Ca²⁺-Ionen war, gelöst. Die Lösung wurde entweder magnetisch mit einem Rührstäbchen oder mit einem Metrohm-Aufsteckrührer durchmischt. Nachdem das Eiweiß in Lösung gegangen war, wurden 1,00 g AHTL und 0,50 g Imidazol nacheinander in fester Form zugegeben. 45 Minuten später wurde nochmals 0,50 g AHTL zugegeben und 100 Minuten danach wurde die klare Lösung zur Abtrennung der anderen Stoffe vom thiolierten Enzym auf eine Säule gepumpt, die mit Sephadex G 25 "fine" gepackt war. Als Laufmittel wurde destilliertes, unter Stickstoff ausgekochtes und nach dem Abkühlen im Vakuum entgastetes Wasser verwendet. Die Säule mit einem Innendurchmesser von 25 mm und einer ausgenutzten Länge von 90 cm wurde mit einem Thermostaten auf 4°C gehalten, es wurde aufsteigend filtriert. Bei einem von einer peristaltischen Pumpe erzeugten Flüssigkeitsdruck von etwa 0,8 bar wurde eine Flußgeschwindigkeit von 1,90 cm³ in der Minute erreicht. Die Verweilzeit des Enzyms auf der Säule war dabei 80 Minuten. Das Eluat der Säule passierte eine Durchflußküvette aus Quarz mit einer Schichtdicke von 0,100 cm. Die Transmission der durch-

fließenden Lösung bei 278 nm wurde registriert, das erhaltene Filtrat in einem 250 cm³-Rundkolben gesammelt, mit flüssigem Stickstoff eingefroren und anschließend gefriergetrocknet. Die Thiolierungsreaktion wurde nach der Ausbeute an thioliertem Enzym, Menge der ins Enzymmolekül eingeführten Gruppen und nach der Aktivität des Enzyms sowie nach seiner Löslichkeit beurteilt.

4.3.2. Maleinimidierung mit N-Ethoxycarbonylmaleinimid

1000 mg des gewünschten Enzyms wurde in einem zylindrischen Reaktionsgefäß in 10 cm³ Wasser gelöst, auf 0°C gekühlt und mit 10 cm³ gesättigter, kalter NaHCO₃-Lösung unter Rühren versetzt. Dann wurde die gewünschte Menge an feingepulvertem ECM zugesetzt und eine Stunde bei 0°C gerührt. Die kalte Lösung setzte schon bei geringer Temperaturerhöhung Kohlendioxid frei. Durch Gelfiltration wurde das reine, maleinimidierte Enzym, wie bei 4.3.1. beschrieben, abgetrennt. Die Enzymlösung wurde dann gefriergetrocknet und Ausbeute, Löslichkeit, Aktivität und Gehalt an reaktiven Maleinimidgruppen untersucht.

4.3.3. Maleinimidierung mit reaktiven Maleinimidocarbonsäureestern

0,25 g Enzym wurden in einem zylindrischen Reaktionsgefäß in einer Lösung aus 1,0 cm³ gesättigtem NaHCO₃ und 9,0 cm³ Wasser gelöst. Nach dem Abkühlen auf 0°C wurde dazu langsam unter gutem Rühren eine Lösung von 0,36 g des Esters in 2,0 cm³ N,N-Dimethylformamid getropft. An der Eintropfstelle entstand eine Trübung, die sofort wieder verschwand. Etwa 20 Sekunden später wurde der gesamte Reaktionsansatz trübe. Die Suspension wurde noch eine Stunde bei 0°C gerührt. Der pH-Wert betrug nach dieser Zeit 7,0. Die Reaktionsmischung wurde jetzt mit 2,0 cm³ gesättigter NaHCO₃-Lösung versetzt und dann mit einer Tischzentrifuge bei etwa 3000 min⁻¹ zentrifugiert. Der abzentrifugierte Niederschlag bestand aus DMF-löslichen Substanzen. Die Enzymlösung wurde per Gelfiltration aufgearbeitet, gefriergetrocknet und das maleinimidierte Enzym durch seine Aktivität, die Ausbeute, Löslichkeit und den Gehalt an Maleinimidgruppen charakterisiert.

4.4. Immobilisierungsreaktionen:

4.4.1. Diskontinuierliches Verfahren

Sechs starkwandige Zentrifugengläser mit einem Innendurchmesser von etwa 13,5 mm und einer Länge von zirka 100 mm wurden um ein zentrales Zentrifugenglas gleicher Abmessungen hexagonal angeordnet und mit Gummiringen und Klebestreifen in dieser Lage fixiert, nachdem sie mit genau abgewogenen (± 0.01 mg) Harzmengen beschickt und gekennzeichnet worden waren. Das Bündel wurde dann in ein Bad gesenkt, das sich auf der gewünschten Immobilisierungstemperatur befand. Genau im Zentrum jedes Glases wurde sodann ein Glasstab so angebracht, daß dieser etwa 5 mm vor dem Boden des Glases endete. Der Durchmesser der Glasstäbe betrug 7,0 mm. Außerhalb der Zentrifugengläser waren die Glasstäbe zusammengeschmolzen und endeten in einem Vibromischer, der die Stäbe in longitudinale Schwingungen versetzen konnte und so das Harz in der Enzymlösung bewegte. Die Gläser wurden dann mit gepufferter Enzymlösung per Pipette beschickt. Ein aliquoter Teil wurde in einem 250 cm^3 -Meßkolben mit 1M Natriumchloridlösung zur Marke aufgefüllt. Nach der vorbestimmten Reaktionszeit wurden die Glasstäbe aus der Reaktionsmischung gezogen und mit Wasser in das jeweilige Zentrifugenglas abgespült. In jedes Glas wurde jetzt eine Sinterglasfritte (D3, 1,0 cm Frittdurchmesser) getaucht, über die mit einer peristaltischen Pumpe die Enzymlösung in jeweils einen 250 cm^3 Meßkolben überführt wurde. Die Gläser wurden dann sukzessiv mit 1M NaCl aufgefüllt, abgepumpt und so fortgefahren, bis die nicht vom Harz gebundene Enzymmenge auf 250 cm^3 aufgefüllt war. Die Natriumchloridlösung wurde dann von den Immobilisaten abgewaschen und diese quantitativ in Präparategläschen mit Rollranddeckeln überführt. Dort wurden sie entweder bei 4°C unter Wasser gelagert oder über ein Sieb im Deckel gefriergetrocknet. Die Lyophilisate wurden dann ebenfalls bei 4°C aufbewahrt. Aus den Enzymkonzentrationen in den Meßkolben wurden die vom Harz aufgenommenen Enzymmengen bestimmt.

4.4.2. Kontinuierliche Verfolgung der Immobilisierungsreaktion

Bei Trägern mit hoher Bindungskapazität wurde bisweilen die Immobilisierungsreaktion direkt optisch verfolgt, nachdem geklärt war, ob unspezifische Adsorption ans Trägermaterial stattfand und in welchem Ausmaß. In ein zylindrisches Reaktionsgefäß mit einem Innendurchmesser von 32 mm wurde eine Enzymmenge genau eingewogen.

Diese Enzymmenge wurde in meist 10,0 cm³ Puffer gelöst, die Lösung durch Eintauchen in ein temperiertes Bad auf die geforderte Immobilisierungstemperatur gebracht und mit einem Aufsteckrührer durch einen plattgedrückten Glasstab gerührt. Mit einer peristaltischen Pumpe wurde die Lösung über eine langstielige Fritte (Filtermaterial D3, Durchmesser 1,0 cm) abgesaugt, durch eine Quarzküvette gedrückt und dann wieder zurück ins Reaktionsgefäß. Die Küvette mit einer Dicke der Flüssigkeitsschicht von 0,100 cm befand sich in einem Beckman-DB-Photometer, dessen Ausgangsimpedanz von 500Ω auf 5 kΩ erhöht worden war. Das Rauschen des Gerätes wurde mit 100 μF gedämpft. Der Nullwert wurde durch Kompensation des Ausgangssignals mit einem Knick-Präzisionsspannungsgeber eingestellt, der 100 Prozent-Abgleich erfolgte mit dem Einstellregler am Gerät, der zuvor gegen ein 10-Wendel-Potentiometer getauscht worden war. Die Anzeige der Meßwerte geschah digital mit einem Keithley-Multimeter (168 Autoranging DMM), die Registrierung wurde mit einem Rikadenki-Kassettenschreiber (Typ T02NI-L) durchgeführt. Die jeweilige Immobilisierungsreaktion wurde gestartet, indem die auf einem Wägeschiffchen genau eingewogene Harzmenge zur Enzymlösung gegeben wurde, nachdem sich die Meßwerte für die optische Dichte der Lösung stabilisiert hatten. Die zu einem bestimmten Zeitpunkt immobilisierte Enzymmenge wurde aus der gemessenen Transmission der Lösung bei 278 nm errechnet.

4.4.3. Kovalente Chromatografie von thioliertem α-Chymotrypsin (tC 16)

10,3 g trockengesaugtes Sephadex G 50, das mit 2-Thiopyridon beladen worden war (s. Abschnitt 4.2.5.1.) wurde mit 0,05 M TRIS-HCl (0,10 M an KCl und 0,001 M an EDTA) vom pH 7,2 äquilibriert. Das Harz wurde dann abgesaugt. Zu dem Harz wurde dann eine Lösung von 146 mg thioliertem α-Chymotrypsin (tC 16) in 10,0 cm³ des gleichen Puffers gegeben und ein Teil der Lösung mit einer peristaltischen Pumpe über eine Stieltfritte abgesaugt, in eine 0,100 cm-Durchflußküvette gepumpt und wieder zurück ins Reaktionsgefäß, so daß die optische Dichte der Lösung bei 278 nm kontinuierlich verfolgt werden konnte. Nachdem die Immobilisierungsreaktion zum Stillstand gekommen war, wurde das Harz mit dem beschriebenen Puffer ausgewaschen, bis die Waschlösung ein Volumen von 250 cm³ erreicht hatte. In dieser Waschlösung wurde die Menge an noch vorhandenen SH-Gruppen

mit DTNB bei 412 nm ermittelt, die optische Dichte bei 278 nm gemessen und daraus die Enzymmenge in der Lösung berechnet und die enzymatische Aktivität der Lösung bei pH 8,5 mit ATEE als Substrat ermittelt. Es wurden in der Lösung 101,36 mg Enzym wiedergefunden mit einer Aktivität von insgesamt 25115 U, also 247,8 U je mg Enzym (75,1 Prozent der Aktivität des nicht thiolierten Enzyms). Jede Enzymmolekül wies im Mittel 4,29 Thiolgruppen auf (die eingesetzte Charge tC 16 trug 5,7 SH-Gruppen je Enzymmolekül).

Ein Teil des gewonnenen Immobilisates wurde gefriergetrocknet und dann von diesem Lyophilisat die Aktivität bestimmt (ATEE, 25°C, pH 8,5). 9,97 mg wiesen 31,5⁴ U auf, die Aktivität des Immobilisates betrug also 3164 U·g⁻¹.

Das Harz wurde dann in 10,0 cm³ TRIS·HCl (0,10 M an KCl und C, CCl₄ M an EDTA) vom pH 7,2 suspendiert, wobei dieser Puffer 0,15 g Dithiothreitol enthielt. Nach kurzer Zeit wurde mit einer peristaltischen Pumpe abgesaugt und mit Puffer solange gewaschen, bis ein Volumen von 50,0 cm³ erreicht war. 0,050 cm³ dieser Lösung hatten eine enzymatische Aktivität von 3,48 U, also waren insgesamt 3480 U reduktiv vom Harz abgelöst worden. Der Enzymgehalt der Lösung wurde optisch bei 278 nm gemessen. Es wurden 22,98 mg α-Chymotrypsin gefunden, die Bestimmung der Thiolgruppen an einem durch Celfiltration an Sephadex G 25 aufgereinigten Teil mit DTNB ergab 10,3 Thiolgruppen je Enzymmolekül.

4.5. Analytische Verfahren

4.5.1. Eiweißbestimmung mit Folin-Ciocalteus Phenolreagenz^{86.87}

Da die Farbreaktion von Proteinen mit dem Folin-Reagenz verhältnismäßig langsam abläuft und auch nach einstündiger Reaktionszeit noch nicht beendet ist, wurde die Eiweißbestimmung nach einem festen Zeitplan durchgeführt, so daß die Reaktionszeit für alle Proben genau gleich war.

Zunächst wurden sehr saubere 25 cm³-Bechergläser gekennzeichnet, jeweils fünf für jede zu untersuchende Eiweißlösung und zusätzlich fünf für einen Eiweißstandart mit genau bekannter Konzentration an der zu untersuchenden Eiweißsorte. In diese fünf Bechergläser wurden zunächst 0,100 cm³, 0,250 cm³, 0,500 cm³, 0,750 cm³ und 1,000 cm³ der zu vermessenden Lösung dosiert, die einen Eiweißgehalt von etwa 50 mg in 250 cm³ Lösung hatte. Mit 0,900 cm³, 0,750 cm³, 0,500 cm³ und 0,250 cm³ 1 M NaCl-Lösung wurden dann

alle Proben auf $1,000 \text{ cm}^3$ aufgefüllt. Ein Becherglas wurde als Referenz für den Vergleichsstrahl des Photometers benutzt und enthielt nur $1,000 \text{ cm}^3$ 1 M NaCl -Lösung. In genau einminütigem Abstand wurden in jedes Glas mit einer Pipette $10,0 \text{ cm}^3$ einer Lösung gegeben, die kurz vor der Zugabe durch Mischen von 100 cm^3 (oder 500 cm^3) $0,10 \text{ M NaOH}$ -Lösung (zweiprozentig an Natriumcarbonat) mit $2,00 \text{ cm}^3$ (oder $10,0 \text{ cm}^3$) Cu-Komplex-Lösung entstanden war. Der Kupferkomplex wurde auf folgende Weise dargestellt: $0,50 \text{ g CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ wurden in etwa 50 cm^3 Wasser gelöst, mit $1,00 \text{ g}$ Kalium-Natrium-Tartrat und weiteren 30 cm^3 Wasser versetzt, dann mit NaOH -Lösung auf $\text{pH} = 8,00$ eingestellt und die entstandene Lösung auf genau 100 cm^3 aufgefüllt.

Nachdem jedes Glas 9,5 Minuten bei Raumtemperatur gerührt worden war, wurden $2,00 \text{ cm}^3$ des Folinreagenzes, das durch Verdünnen der käuflichen Lösung mit Wasser auf das dreifache Volumen dargestellt wurde, unter starkem Rühren schnell in die Lösung gespritzt. 60 Minuten danach wurde in einer $1,000 \text{ cm}$ -Quarzkilvette die optische Dichte der Lösung bei 750 nm gegen die Referenzlösung aus $1,000 \text{ cm}^3$ $1 \text{ M Natriumchloridlösung}$ vermessen, die auf die gleiche Weise wie die Eiweißlösungen behandelt worden war. Die gegen die Volumina der Eiweißlösungen aufgetragenen Werte für die optische Dichte bildeten Geraden, die ihren Schnittpunkt im Ursprung des Koordinatensystems hatten. Ihre Steigungen wurden durch Mittelung aus den Koordinaten der Meßpunkte errechnet und mit diesen die genauen Eiweißgehalte der zu untersuchenden Lösungen bestimmt. Die Korrektur erfolgte nach der Methode der kleinsten Fehlerquadrate.

4.5.2. Quantitative Thiolgruppenbestimmung mit Bis-(4-nitrophenyl)-disulfid-3,3'-dicarbonsäure^{56,117,118}

Lösliche Proben wurden zunächst in einer kleinen, genau bekannten Wassermenge gelöst. Jeweils $20,0 \text{ cm}^3$ $0,10 \text{ M Natriumphosphat-Puffer}$ mit einem pH -Wert von $8,0$ wurden dann in zwei Bechergläsern mit $1,00 \text{ cm}^3$ $0,010 \text{ M DTNE-Lösung}$ in $0,10 \text{ M Phosphatpuffer}$ ($\text{pH} = 7,0$) versetzt. Zum Inhalt des einen Becherglases wurde dann ein Teil der Lösung des zu untersuchenden Stoffes pipettiert, zum anderen Becherglas die genau gleiche Menge Wasser. (Referenzlösung). Mit dieser Referenzlösung wurde etwa 15 Minuten später am Photometer bei 412 nm der 100-Prozent-Abgleich vorgenommen und dann die Trans-

mission der gelben Lösung bestimmt. Je nach Farbtiefe wurden Küvetten mit 0,100 cm, 0,200 cm oder 1,000 cm Schichtdicke verwendet.

Unlösliche, SH-haltige Proben wurden genau abgewogen und dann mit einer Mischung von 20,0 cm³ 0,10 M Natriumphosphatpuffer pH = 8,0 und 1,00 cm³ der oben beschriebenen DTNB-Lösung versetzt. Die gefärbte Lösung wurde über eine Stieltfritte (D3, 1,0 cm Durchmesser) in einen geeigneten Meßkolben abgepumpt. Dann wurden wieder 21 cm³ Reagenzlösung zugesetzt, abgepumpt und dies solange fortgesetzt, bis die abgepumpte Lösung farblos war. Die Farbtiefe des Inhaltes des Meßkolbens wurde gegen eine Referenzlösung wie beschrieben bei 412 nm bestimmt und daraus der SH-Gehalt der Probe errechnet.

4.5.3. Quantitative Bestimmung von Maleinimidgruppen

Drei 50 cm³-Bechergläser wurden jeweils mit 1,00 cm³ DTNB Reagenz und 20,0 cm³ des 0,10 M Phosphatpuffers (pH 8,0) beschickt. Drei weitere 25 cm³-Bechergläser wurden mit je 10,0 cm³ Wasser gefüllt, nachdem in das erste Glas 15 mg bis 20 mg der zu untersuchenden Probe genau eingewogen worden waren. In jedes dieser Gläser wurden 2,00 cm³ einer etwa 9 mM Cysteinlösung pipettiert. Aus diesen Gläsern wurde je 1,00 cm³ entnommen und in die vorbereitete DTNB-Lösung gegeben. Mit der farblosen Referenzlösung wurde bei 412 nm der 100-Prozent-Abgleich durchgeführt. Gegen diese Referenzlösung wurde die Transmission der beiden anderen Lösungen gemessen und daraus ihr Cystein-Gehalt berechnet. Die Differenz der Cysteinmenge entsprach der eingesetzten Maleinimidmenge.

4.5.4. Messung der Quellung von Polymeren

Die Vorrichtung zur Quellungsmessung bestand aus einem "Quellungsrohr", welches aus alten Büretten hergestellt worden war, indem an die eine Seite des Rohres koaxial ein Glaszylinder von 32 mm Durchmesser und einer Länge von etwa 5 cm angeschmolzen wurde. Dieser Glaszylinder war mit einem Schliffstopfen verschiebbar. Das andere Ende des Bürettenrohres wurde reversibel entweder einfach mit einem kleinen Gummistopfen oder einer kleinen planen Glasplatte verschlossen, die mit Siliconschlauch oder einem Klebstoff fixiert worden war. In dieses Bürettenrohr wurde das zu vermessende Harz bis zu einer bestimmten Höhe gestreut, dann wurde das Rohr mit der gewählten Flüssigkeit gefüllt und

die Quellung des Polymeren als Zunahme seines Volumens protokolliert. Das Schüttvolumen des eingesetzten trockenen Polymeren wurde aus seinem Gewicht und dem Volumen in dem Quellungsrohr berechnet.

4.5.5. Messung der Enzymaktivitäten

4.5.5.1. pH-statische Aktivitätsmessung.

Bei den pH-statischen Messungen wurde folgender Aufbau verwendet: Ein doppelwandiger Glasbecher (Volumen je nach Art der Messung 15 cm^3 , 25 cm^3 oder 50 cm^3) wurde mit einem Thermostaten durch Umpumpen der Thermostatenflüssigkeit auf die gewünschte Temperatur gebracht. In das Gefäß ragte eine Salzbrücke mit gesättigter Kaliumchloridlösung, die zum Meßgefäß hin mit einem Diaphragma (MgCl) verschlossen war, und in die am anderen Ende eine Kalomel-Elektrode eintauchte. Als Meßelektrode wurde eine Glaselektrode verwendet (Ingold, Ag/AgCl, Innenpuffer pH 7). In das Reaktionsgefäß tauchte außerdem eine Kapillare aus Poly(ethylen), durch die entweder Säure oder Lauge aus einer automatischen Bürette dosiert werden konnten. Die Flüssigkeit in dem Gefäß konnte mit einem kleinen Rührer aus Glas schnell durchmischt werden. Das Elektrodensystem war mit einem pH-Stat verbunden, an dem der pH-Wert der Lösung (Sollwert) eingestellt werden konnte. Bei einer Abweichung von diesem Sollwert wurde die Bürette durch Impulse dazu veranlaßt, Säure oder Lauge zu dosieren. Mit wachsender Abweichung vom Sollwert nahm hier die Anzahl an Impulsen zu. Die in einem einstellbaren Zeitintervall zugegebene Menge wurde mit einem Matrixdrucker ausgedruckt. Aus diesem Wert und der eingesetzten Enzymmenge wurde dann die Enzymaktivität berechnet.

4.5.5.2. Absorptiostatische Aktivitätsmessung

In einem doppelwandigen, durch Flüssigkeitsumlauf thermostatisierten Glasbecher mit einem Volumen von etwa 25 cm^3 wurden $20,0\text{ cm}^3$ Pufferlösung (0,050 M Phosphatpuffer pH 7,0) vorgelegt und auf 25°C gebracht. Über eine Stieltfritte wurde ein Teil dieser Lösung mit einer Kreiselpumpe aus Glas/PTFE durch eine Quarzküvette gepumpt ($d = 0,100\text{ cm}$) und konnte danach ins Reaktionsgefäß zurückfließen. Die Transmission der Lösung in der Küvette wurde bei 240 nm gemessen, und mit einem eingestellten Sollwert verglichen. Wurde dieser

Wert überschritten, so wurde automatisch unter intensivem Rühren solange etwa 30-prozentige Wasserstoffperoxidlösung dosiert, bis der eingestellte Wert wieder erreicht war. Die zu Beginn dosierte Peroxidmenge, die notwendig war, um den Phosphatpuffer auf die gewünschte Peroxidkonzentration zu bringen, diente dabei gleichzeitig zur Gehaltsbestimmung der Peroxidlösung. Die Konzentration an Wasserstoffperoxid wurde hier meist zu $0,020 \text{ Mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ gewählt. Nachdem die Lichttransmission der Lösung konstant war, wurde in das Reaktionsgefäß die Katalase-Probe gegeben und der Peroxidverbrauch je Zeiteinheit ebenfalls ausgedruckt.

4.5.5.3. Bestimmung der Aktivität von Lysozym

In einem thermostatisierten Reaktionsgefäß mit einem Volumen von 15 cm^3 wurden $10,0 \text{ cm}^3$ einer Suspension von $6,0 \text{ mg}$ *Micrococcus lysodeicticus* in $0,066 \text{ M}$ Phosphatpuffer pH 6,2 bei 25°C gerührt und ein Teil dieser Lösung mittels Stiefelfritte durch eine Durchflußküvette gepumpt. Die Lichttransmission dieser Lösung wurde bei 450 nm registriert (Schichtdicke $0,100 \text{ cm}$). Nachdem sich die Lösung stabilisiert hatte, wurde das Enzym zugegeben und die Zunahme der Transmission aufgezeichnet. Aus diesen Werten wurde dann die Aktivität des Enzyms berechnet.

5. Zusammenfassung

Es war das Ziel der vorliegenden Arbeit, die Additionsreaktion von Thiolgruppen an die Doppelbindung des Maleinimids auszunutzen, um kovalent Enzyme an hochmolekularen Trägern zu immobilisieren. Diese Immobilisierungsreaktion sollte untersucht und optimiert werden.

Im Verlauf der Untersuchungen zeigte es sich, daß vernetzte Polymere wie vernetzter Poly(vinylalkohol) und Copolymere aus Acrylnitril, 1,4-Divinylbenzol und Acrylsäure sowie Copolymere aus Maleinsäureanhydrid mit 1,4-Divinylbenzol und Ethylvinylether sich mit Maleinimidderivaten umsetzen ließen, so daß reaktive Träger hergestellt werden konnten, die für Immobilisierungsreaktionen geeignet waren. Vernetzte Copolymere auf der Basis von Carbonsäurechloriden und gemischten Anhydriden konnten nicht mit Maleinimidgruppen ausgerüstet werden.

Die Vernetzung des Poly(vinylalkohol)s wurde mit Terephthalaldehyd durchgeführt. Um Träger mit verschieden hoher Quellbarkeit in Wasser zu erhalten, wurden verschieden große Mengen an Vernetzer (ein, zwei und fünf Molprozent Terephthalaldehyd bezogen auf die OH-Gruppen des Poly(vinylalkohol)s) eingesetzt. Die vernetzten Harze zeigten gute bis sehr gute mechanische Stabilität, sie wurden in den weiteren Reaktionen als Granulat mit mittleren Korngrößen zwischen 0,10 mm und 0,20 mm eingesetzt. Zur Darstellung reaktiver Träger wurden diese Harze mit 2-Maleinimidoacetaldehyddimethylacetal, welches aus Maleinsäureanhydrid und 2-Aminoacetaldehyddimethylacetal gewonnen wurde, umgesetzt. Dabei wurde die Maleinimidgruppe mit den Polymeren über eine Acetalgruppe verknüpft. Die so gebildeten reaktiven Träger (Träger 1 bis Träger 3) waren farblose Harze. Ihre Quellbarkeit war nicht vom pH-Wert abhängig. Sie enthielten 1,2 mMol bis 1,8 mMol Maleinimidgruppen je Gramm Träger, die durch charakteristische Absorptionsbanden bei 700 cm^{-1} und 830 cm^{-1} nachgewiesen werden konnten.

Nach der Reaktion der reaktiven Träger mit Thiolgruppen in alkalischem Milieu färbten sie sich charakteristisch rot. Diese Färbung zeigten auch die niedermolekularen Maleinimidderivate. Der Gehalt an reaktiven Maleinimidgruppen konnte bequem

durch die Dauer der Reaktion mit dem Maleinimido-acetal eingestellt werden. Mit einer niedermolekularen SH-Verbindung, dem Cystein, und mit 5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoesäure) (DTNB, Ellmans Reagenz), einem Reagenz auf SH-Gruppen, wurde die zeitliche Abhängigkeit der Reaktion von SH-Gruppen mit dem Träger 3 bei verschiedenen pH-Werten untersucht. Dabei wurde festgestellt, daß die Reaktion der Thiolgruppen mit diesem Träger bei pH-Werten um pH 8 am schnellsten verläuft. Oberhalb dieses pH-Wertes scheint durch Hydrolyse die Menge der Maleinimidgruppen am Träger abzunehmen.

Die vernetzten Harze PAN 1 bis PAN 5 wurden durch Copolymerisation von Acrylnitril mit 1,4-Divinylbenzol als Vernetzer dargestellt. Die Harze PAN 7 und PAN 8 enthielten zusätzlich Acrylsäure als Comonomer, PAN 6 wurde durch Copolymerisation von Acrylnitril, n-Butylvinylether und 1,4-Butandioldivinylether als Vernetzer gewonnen, dieses Polymere war zu Immobilisierungsreaktionen aber kaum geeignet. Bis auf PAN 6 wiesen alle aus Acrylnitril dargestellten Harze eine Schwammstruktur auf und waren bis auf PAN 7 und PAN 8 in Wasser nicht quellbar. Die Nitrilgruppen dieser Harze wurden mit N-Methylolmaleinimid bei niedrigen Temperaturen in konzentrierter Schwefelsäure umgesetzt. Zuvor wurde der Verlauf der Reaktion zwischen Propionsäurenitril oder 3-Brompropionsäurenitril und N-Methylolmaleinimid untersucht und die Produkte daraus als N-(Maleinimidomethyl)-carboxamidopropan beziehungsweise N-(Maleinimidomethyl)-3-bromcarboxamidopropan identifiziert. Aus den Harzen PAN 2, PAN 3 und PAN 6 bis PAN 8 und N-Methylolmaleinimid wurden die maleinimidgehaltigen reaktiven Träger 5 bis Träger 9 dargestellt. Sie wiesen zwischen 1,0 mMol und 2,1 mMol Maleinimidgruppen je Gramm auf. Mit dem Träger 5 und dem Träger 9 wurde bei pH 4 und bei pH 8 die zeitliche Abhängigkeit der Reaktion mit Cystein untersucht. Die Cysteinaufnahme verlief hier wesentlich schneller, als bei den Trägern aus Poly(vinylalkohol). Schon nach 30 Minuten war die Umsetzung abgeschlossen. Die carboxylhaltigen Träger 8 und Träger 9 zeigten eine pH-abhängige Quellbarkeit; das Schüttvolumen vom Träger 8 nahm bei Erhöhung des pH-Wertes von pH 2 auf pH 10 um das 1,5-fache, das des Trägers 9 um fast das fünffache zu.

Ein weiterer Träger mit Maleinimidgruppen konnte durch Veresterung eines Copolymeren aus Maleinsäureanhydrid, 1,4-Divinylbenzol und Ethylvinylether mit N-Methylolmaleinimid in N-Methylmorpholin erhalten werden. Dieser Träger 18 enthielt 2,54 mMol Maleinimidgruppen je Gramm. Im Verlauf der weiteren Untersuchungen zeigte es sich, daß dieser Träger auch in der Lage war, Enzyme ohne SH-Gruppen zu immobilisieren. Durch Veresterung mit anderen N-Methylolverbindungen wurden Träger dargestellt, die dieses Verhalten ebenfalls zeigten. Ihre Fähigkeit, hohe Mengen an Protein zu immobilisieren, beruhte wahrscheinlich auf der Instabilität ihrer Estergruppen, die durch räumliche Nähe der Carboxylatgruppen erhöht wird. Die Aminogruppen der Proteine reagieren wahrscheinlich mit den Estergruppen des Trägers zu Amiden. Auf diese Weise erfolgt eine kovalente Immobilisierung der Enzyme an diesen Trägern.

Außer den Trägern mit Maleinimidgruppen wurden hier auch solche mit Thiolgruppen dargestellt. Diese wurden zur Aufreinigung von thioliertem Enzym, zur Thiolierung von Enzym und zur Immobilisierung von Enzymen, die mit Maleinimidgruppen derivatisiert worden waren, eingesetzt. Diese thiolgruppenhaltigen Träger wurden aus vernetztem Poly(vinylalkohol) entweder durch eine Reaktion mit 2-Mercaptoacetaldehyddimethylacetal (Träger 10 bis Träger 12) gebildet oder durch Umsetzung mit Epichlorhydrin, anschließender Reaktion mit Natriumthiosulfat und Reduktion erhalten (Träger 13 bis Träger 15). In derselben Weise wurden auch Sepharose 4B und Sephadex G 50 mit SH-Gruppen ausgerüstet (Träger 16 und Träger 17). Der Gehalt an Thiolgruppen lag bei allen Trägern unter 0,50 mMol je Gramm, er wurde durch Reaktion mit DTNE bestimmt. Die Träger, die durch Reaktion mit dem 2-Mercaptoacetal entstanden waren, erwiesen sich als instabil, sie waren für Immobilisierungsreaktionen ungeeignet.

Bei den Immobilisierungsreaktionen wurden verschiedene Enzyme eingesetzt. Zum Teil enthielten diese SH-Gruppen (Urease, Katalase, Papain), durch die sie mit den reaktiven Trägern kovalent verbunden werden konnten. Die Proteine ohne SH-Gruppen mußten für die Immobilisierungsreaktion zunächst thioliert werden. So wurden α -Chymotrypsin, Ribonuclease und Lysozym mit SH-Gruppen versehen.

Die Thiolierungsreaktionen wurden mit N-Acetyl-DL-homocysteinethiolacton (AHTL) als thiolierendem Reagenz in gepufferten Lösungen bei 0°C durchgeführt. Das thiolierte Enzym wurde anschließend durch Gelfiltration aufgereinigt und durch Lyophilisation getrocknet. Bei diesen Thiolierungsreaktionen entstanden Gemische von verschiedenen thiolierten Enzymen mit einem durchschnittlichen Gehalt von bis zu sechs SH-Gruppen je Enzymmolekül. Dieser Thiolgehalt wurde bei α -Chymotrypsin, Trypsin und Ribonuclease erhalten. Lysozym war durch AHTL nicht unzerstört thiolierbar. Auch die anderen thiolierten Enzyme zeigten zum Teil gravierende Veränderungen in ihren Eigenschaften: So entstanden nach den Thiolierungsreaktionen oft Produkte mit niedrigen Enzymaktivitäten. Auch waren in einigen Fällen insbesondere bei kleinen pH-Werten und hohen Ionenstärken die thiolierten Produkte nicht mehr löslich.

Die Thiolierung von α -Chymotrypsin wurde ebenfalls mit polymeren Thiolierungsreagenzien untersucht. Die polymeren Thiolierungsreagenzien I und II wurden durch Reaktion von N-Succinimidyl-3-(2-pyridyldithio)propionat (SPDP) mit dem SH-haltigen Träger 14 (hergestellt auf der Basis von vernetztem Poly(vinylalkohol)) oder dem SH-haltigen Träger 16 (aus Sepharose 4B) hergestellt. Für die Thiolierung war nur das aus Sepharose entstandene Reagenz II wohl wegen seiner hohen Quellbarkeit geeignet. Wegen der geringen Ausbeute an thioliertem Enzym war diese Methode der Thiolierung zur präparativen Darstellung größerer Mengen thiolierter Enzyme unbrauchbar. Auch zeigte es sich, daß zur Immobilisierung großer Enzymmengen die Enzymmoleküle eine größere Anzahl an SH-Gruppen aufzeigen müssen. Bei der Thiolierung mit dem polymeren Thiolierungsreagenz II entstand aber nur ein Produkt mit einem Durchschnittswert von 1,5 SH-Gruppen je Enzymmolekül.

Für die Immobilisierung von Enzymen an den SH-gruppenhaltigen Trägern mußten die Enzymmoleküle mit Maleinimidgruppen ausgestattet werden. Diese Modifizierung der Enzymmoleküle mit Maleinimiddervivaten erfolgte mit aktivierten N-Hydroxysuccinimidestern oder mit N-Ethoxycarbonylmalainimid (ECM). Die Maleinimi-

dierung mit ECM führte zu Produkten mit einem höheren Gehalt an reaktiven Gruppen im Enzymmolekül, als er bei den Thiolierungsreaktionen erreichbar war. So konnten in einigen Fällen bis zu zwölf Maleinimidgruppen ins Enzymmolekül eingeführt werden. Die Maleinimidierungsreaktionen mit den aktiven Maleinimidocarbonsäureestern ergeben ebenfalls derivatisierte Enzymmoleküle mit einem hohen Gehalt an Maleinimidgruppen, hier wurden gegenüber der Maleinimidierung mit ECM auch höhere Aktivitäten der modifizierten Enzyme gemessen. Eine Verminderung der Löslichkeit der maleinimidierten Enzyme konnte nur selten beobachtet werden.

Die Immobilisierungsreaktionen wurden zunächst am Träger 3 untersucht. Dieser Träger wies keine ionischen Gruppen auf, daher konnte die Immobilisierungsreaktion hier nicht durch pH-abhängige Quellung des Trägers oder durch ionische Bindung der Enzyme an dem Träger beeinflusst werden. Bei den Immobilisierungsreaktionen von thioliertem α -Chymotrypsin zeigte es sich, daß der Luftsauerstoff nur einen ganz geringen, vernachlässigbaren Einfluß auf die Immobilisierungsreaktionen hatte.

Die Steigerung der Enzymkonzentration bewirkte zunächst einen sehr steilen Anstieg der immobilisierten Enzymmenge. Oberhalb einer Enzymkonzentration von etwa 1,5 Prozent fiel bei weiterer Steigerung der Enzymkonzentration die immobilisierte Enzymmenge genau so stark ab. Nach dem Durchlaufen eines Minimums konnte ein leichter Anstieg der immobilisierten Enzymmenge bei noch höherer Enzymkonzentration beobachtet werden. Dieser Effekt, der auch vom pH-Wert bei der Immobilisierungsreaktion und von der Temperatur beeinflusst wurde, konnte durch den Zusammenschluß einzelner α -Chymotrypsinmoleküle zu Aggregaten erklärt werden, er trat besonders deutlich bei niedrigen Reaktionstemperaturen in Erscheinung.

Eine Erhöhung der Reaktionstemperatur bei den Immobilisierungsreaktionen oder der Zusatz von strukturaufweitenden Reagenzien wie Harnstoff bewirkten eine Zunahme der immobilisierten Enzymmenge, gleichzeitig sank aber dabei die relative Aktivität der immobilisierten Enzyme so stark, daß auch die Aktivität der Immobilisate zurückging. Ferner wurde festgestellt, daß es ungünstig war, bei pH-Werten zu immobilisieren, bei denen wegen hoher Enzymaktivität durch Autolyse von gelöstem oder immo-

bilisiertem Enzym inaktive Bruchstücke am Träger gebunden wurden. Der Vergleich von Immobilisaten, die aus thiolisiertem α -Chymotrypsin mit unterschiedlichem Gehalt an Thiolgruppen entstanden waren, ergab, daß es hier besser war, Enzymchargen mit hohem SH-Gehalt einzusetzen, da dann besonders viel Enzym an den Trägern immobilisiert wurde und hohe Aktivitäten der Immobilisate erzielt werden konnten. Die relativen Aktivitäten der Immobilisate aus Enzymchargen mit hohem SH-Gehalt war, vielleicht durch Mehrfachbindung eines Enzymmoleküls an dem Träger geringer, als beim Einsatz von Chargen mit niedrigem SH-Gehalt.

Alle Immobilisate aus Träger 3 wiesen hohe Stabilität auf. Mit Ausnahme der Immobilisate aus Katalase zeigten alle noch nach jahrelanger Lagerung in wäßriger Suspension bei 4°C ihre ursprüngliche Aktivität. Erst mehrwöchige Lagerung beim pH 8 und bei 25°C führte zu geringen Aktivitätseinbußen. Die pH-Profile der enzymatischen Aktivitäten der immobilisierten Enzyme waren geringfügig (etwa eine halbe pH-Einheit) zu höheren pH-Werten verschoben. Die scheinbaren K_M -Werte der Immobilisate waren wesentlich größer als die K_M -Werte der löslichen Enzyme.

Aus den durchgeführten Untersuchungen konnten optimale Reaktionsbedingungen für die Immobilisierungsreaktion abgeleitet werden (0° bis 4°C, pH 6, Enzymkonzentration etwa 1,3 Prozent, Dauer der Immobilisierungsreaktion etwa vier Stunden). Unter solchen Bedingungen ließen sich zum Beispiel aus α -Chymotrypsin und Träger 3 Immobilisate mit Aktivitäten von über 2400 U je Gramm Immobilisat erreichen.

Die reaktiven Träger aus Poly(acrylnitril) reagierten wesentlich schneller mit den thiolierten Enzymen, als die Träger auf Poly(vinylalkohol)-Basis, was auf ihre Schwammstruktur zurückgeführt wurde. Beim pH 8 war eine Immobilisierungsreaktion nach einer Stunde fast beendet. Außerdem konnten an diesen Trägern höhere Enzymmengen gebunden werden, als an den Trägern aus Poly(vinylalkohol). Auch hier zeigte sich bei den Immobilisierungsreaktionen nur ein sehr geringer Einfluß des Sauerstoffs. Wegen der Carboxylgruppen der Träger 8 und 9 und der damit verbundenen Quellbarkeit dieser Träger bei höheren pH-Werten wurde der Einfluß des pH-Wertes auf die Immobilisierung für den Träger 5 und den Träger 9 untersucht. Bei der Immobilisierung an dem neutralen Träger 5 nahm die immobilisierte Enzymmenge

mit erhöhtem pH-Wert stark ab. Trotz höherer relativer Aktivität bei hohem Immobilisierungs-pH wiesen die Immobilisate deshalb nur geringe Aktivitäten auf. Durch die Quellbarkeit des Trägers 9, die besonders bei hohen pH-Werten groß war, nahm die immobilisierte Enzymmenge oberhalb von pH 7 wieder zu. Da die relative Aktivität bei hohen pH-Werten abnahm, konnten Immobilisate mit hoher Aktivität nur dann erhalten werden, wenn bei kleinen pH-Werten immobilisiert worden war.

Bei allen Immobilisierungsreaktionen wiesen die Immobilisate mit Träger 9 infolge seiner besseren Quellbarkeit wesentlich höhere relative Aktivitäten auf, als die Immobilisate mit Träger 5. Der Vergleich der Immobilisate verschiedener thiolierter Enzyme an den Trägern 5 und 9 zeigte, daß Träger 9 bei hohen pH-Werten auch größere Mengen Enzym immobilisierte, als Träger 5. Bei pH-Werten, bei denen der Träger 9 noch nicht stark gequollen war, wurden Enzyme mit kleineren isoelektrischen pH-Werten am neutralen Träger 5 in höheren Mengen immobilisiert. Die Größe der Enzymmoleküle spielte bei diesen Immobilisierungsreaktionen ebenfalls eine Rolle: Effekte aus der Aggregatbildung des α -Chymotrypsins wurden hier nicht beobachtet, aber bei der Immobilisierung der Katalase (Molekulargewicht 232400 g·Mol⁻¹) und der Urease (Molekulargewicht 483000 g·Mol⁻¹) wurde von der größeren Urease wesentlich weniger immobilisiert, als von der Katalase.

Alle Immobilisate mit den Trägern 5 bis 9 wiesen eine hohe Stabilität auf. Die pH-Profile ihrer Aktivitäten unterschieden sich kaum von denen der löslichen Enzyme, nur die Immobilisate aus Trypsin und α -Chymotrypsin mit den sauren Trägern 8 und 9, an denen wesentlich mehr Enzym gebunden war, wiesen eine Verschiebung ihrer pH-Profile um etwa eine pH-Einheit zu höheren pH-Werten hin auf. Dies kann durch die Anreicherung des Produkts der enzymatischen Spaltung, hier einer Säure, in den Immobilisatpartikeln erklärt werden. Bei der immobilisierten Urease, bei der das eine Produkt der enzymatischen Spaltung eine Base ist, wurde eine Verschiebung der maximalen Aktivität zu kleineren pH-Werten (pH 4) beobachtet. Unterhalb pH 3 ging die enzymatische Aktivität der immobilisierten Urease irreversibel verloren.

Während die Immobilisierungsreaktion an Trägern aus Poly(vinyl-alkohol) besonders von der Enzymkonzentration abhängig war, wirkte sich bei den Trägern aus Poly(acrylnitril) hauptsächlich die Menge des zur Immobilisierung eingesetzten Enzyms aus. Dies wird auf die große innere und äußere Oberfläche dieser Träger und die damit verbundene gute Zugänglichkeit (auch von Enzymaggregaten) der reaktiven Gruppen an der Harzoberfläche zurückgeführt. Dadurch waren Ausbeuten an immobilisiertem Enzym bis zu 30 Prozent erzielbar und die Menge des immobilisierten Enzyms überstieg oft 250 mg je Gramm Träger. Bei der Umsetzung von viel thioliertem Enzym mit wenig Träger konnten Immobilisate erhalten werden, die mehr als ein Gramm Enzym je Gramm Träger enthielten. Ein solches Immobilisat wies allerdings eine nur geringe relative Aktivität auf, so daß es zumindest im Falle des α -Chymotrypsins nicht wirtschaftlich ist. Immobilisate mit hohem Enzymgehalt auf diese Weise darzustellen.

Da bei diesen Immobilisierungsreaktionen nie mehr als 30 Prozent der angebotenen Enzymmenge immobilisiert werden konnten, wurde untersucht, ob der Thiolierungsgrad des Enzyms die Immobilisierungsausbeute begrenzt. Dazu wurde thioliertes α -Chymotrypsin durch kovalente Chromatografie an dem mit 2-Thiopyridon aktivierten Träger 17 von nicht thioliertem Enzym befreit. Die mittlere Anzahl an SH-Gruppen am Enzym konnte dadurch von 5,7 SH-Gruppen auf 10,7 SH-Gruppen erhöht werden. Die dabei gewonnene höher thiolierte Enzymcharge wies aber eine geringere Aktivität auf, als das Enzymgemisch mit weniger SH-Gruppen. Das reduktiv von Träger 17 abgelöste, thiolierte Enzymgemisch wurde anschließend am Träger 5 immobilisiert. Auch jetzt konnten nur wenig mehr als 30 Prozent der angebotenen Menge des thiolierten Enzymgemisches immobilisiert werden. Daraus konnte gefolgert werden, daß die Immobilisierungsausbeute hier vom Thiolierungsgrad nicht abhängig war.

Bei der Immobilisierung von Enzymen, substituiert mit Maleinimidgruppen, an den SH-haltigen Trägern 10 -15 wurde gefunden, daß Träger 13 am besten zur Immobilisierung geeignet war. Bei der Untersuchung der Abhängigkeit der Immobilisierungsreaktion vom pH-Wert, von der Reaktionstemperatur und von der Konzentration des eingesetzten Enzyms sowie von der Zeit konnte festge-

stellt werden, daß die Immobilisate des maleinimidierten α -Chymotrypsins mit Träger 13 erheblich höhere relative Aktivitäten aufwiesen, als die Immobilisate, hergestellt aus thioliertem α -Chymotrypsin mit maleinimidhaltigen reaktiven Trägern. Niedriger pH-Wert bei den Immobilisierungsreaktionen sowie niedrige Temperatur und kurze Dauer der Immobilisierungsreaktionen waren hier günstig. Die Immobilisierung der maleinimidierten Enzyme an dem Träger 13 aus Poly(vinylalkohol) ergab geringere immobilisierte Enzymmengen, als die Immobilisierung von thiolierten Enzymen an den Poly(vinylalkohol)-Trägern, ausgestattet mit Maleinimidgruppen. Bei der Immobilisierung von maleinimidiertem α -Chymotrypsin an dem Träger 13 wurden Immobilisate erhalten, deren Aktivität bei etwa $2000 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$ lagen. Wie bei den Immobilisaten aus thioliertem α -Chymotrypsin und dem maleinimidhaltigen Träger 3 waren auch hier die K_M -Werte der Immobilisate etwa zehnmal größer, als die des gelösten Enzyms.

Von allen hier beschriebenen Trägern konnten an die Träger 18 bis 20, hergestellt aus Copolymerisaten des Maleinsäureanhydrids und Methylolverbindungen von Imiden, die größten Enzymmengen immobilisiert werden. Es konnte festgestellt werden, daß hier die Immobilisierung nicht über Thiolgruppen des Enzyms erfolgte. Sie verlief hier in zwei Schritten. Zunächst wurde das Enzym von den Trägern ionisch gebunden. Erst dann erfolgte die kovalente Immobilisierung. Die ionische Bindung war reversibel. Durch hohe Elektrolytkonzentrationen konnte das ionisch gebundene Enzym wieder herausgewaschen werden. Diese elektrostatische Enzymaufnahme verlief sehr schnell, sie war in einigen Fällen bereits nach zehn Minuten abgeschlossen. Die nachfolgende Ausbildung der kovalenten Bindung dauerte etwa 30 Minuten. Danach war das Enzym irreversibel an dem Träger kovalent gebunden. Die Bindung erfolgte wahrscheinlich über Amidgruppierungen. Sie wurden wahrscheinlich durch Reaktion der labilen Estergruppen aus den Methylolverbindungen der Imide und den Maleinsäureanhydridgruppen der Polymeren und den Aminogruppen der Enzyme gebildet. Ebenfalls kann eine anchimere Wirkung der Nachbar-carboxylgruppen auf die Estergruppierungen am Polymeren ange-

nommen werden. Es ist möglich, daß zwischenzeitlich aus der labilen Estergruppierung und der Nachbarcarboxylgruppe sich intermediär Anhydridgruppen bilden und die Aminogruppen der Enzyme nicht nur mit den labilen Estergruppen sondern auch mit diesen Anhydridgruppen reagieren. Es wurde an niedermolekularen Modellverbindungen versucht, den Immobilisierungsmechanismus zu klären. Die Hydrolyse der reaktiven Estergruppen wurde eingehend untersucht. Der genaue Mechanismus der Immobilisierung konnte aber trotz sorgfältiger Untersuchungen nicht endgültig geklärt werden. Bei der Immobilisierung von α -Chymotrypsin mit diesen Trägern konnten meist um 250 mg Enzym je Gramm Träger immobilisiert werden. In vielen Fällen wurden weit größere Mengen Enzym gebunden, in manchen Fällen bis zu 500 mg je Gramm Träger. Die Immobilisate wiesen, verglichen mit anderen sehr hohe Aktivitätswerte auf ($3500 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$ bis $9000 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$ bei Immobilisaten aus α -Chymotrypsin).

Während die in dieser Arbeit beschriebenen Träger auf Poly(vinylalkohol)-Basis und die Träger aus Copolymeren des Acrylnitrils nur Enzyme immobilisieren konnten, die SH-Gruppen trugen, und die reaktiven Thiolgruppenhaltigen Träger nur mit Maleinimidgruppen substituierte Enzyme immobilisieren konnten, konnten die Träger, hergestellt aus Copolymeren des Maleinsäureanhydrids und Methylolverbindungen von Imiden, jedes angebotene Enzym schnell und in großen Mengen fixieren. Legt man auf die spezifische Bindung über SH-Gruppen keinen Wert, so sind die Träger hergestellt aus Copolymeren des Maleinsäureanhydrids allen anderen hier aufgeführten Trägern weit überlegen. Alle hier beschriebenen Träger ergaben stabile Immobilisate, deren Eigenschaften unter Berücksichtigung der hier gefundenen Ergebnisse für beliebige Anwendungen optimierbar sind.

6. Literaturverzeichnis

- 1 E. J. Morgan, E. Friedmann, Biochem. J. 32(1938)733
- 2 D. H. Marrian, J. Chem. Soc. 1949 1515
- 3 R. Benesch, R. E. Benesch, M. Gutcho, L. Laufer, Science 123
(1956)981
- 4 C. C. Lee, E. R. Samuels, Can. J. Chem. 39(1961)1152
- 5 D. G. Smyth, H. Tuppy, Biochim. Biophys. Acta 168(1968)173
- 6 R. G. Barradas, Can. J. Chem. 54(1976)1400
- 7 S. Matsui, H. Aida, Nippon Kagaku Kaishi, J. Chem. Soc. Japan
11(1978)1521
- 8 A. Piutti, Gazz. Chim. Ital. 18(1888)483
- 9 E. Roberts, G. Rouser, Anal. Chem. 30(1958)1291
- 10 D. G. Smyth, A. Nagmatsu, S. Fruton, J. Am. Chem. Soc. 82(1960)4600
- 11 J. Leslie, D. L. Williams, G. Gorin, Anal. Biochem. 3(1962)257
- 12 A. Witter, H. Tuppy, Biochim. Biophys. Acta 45(1960)429
- 13 K. -C. Tsou, J. Am. Chem. Soc. 82(1955)4613
- 14 Y. Kankoa, M. Machida, H. Kokubun, T. Sekine, Chem. Pharm.
Bull. Tokyo 16(1968)1746
- 15 R. P. Liburdy, J. Phys. Chem. 82(1978)870
- 16 C. F. Brewer, J. P. Riehm, Anal. Biochem. 18(1967)248
- 17 N. E. Sharpless, M. Flavin, Biochemistry 5(1966)2963
- 18 A. H. Gold, H. L. Segal, Biochemistry 4(1965)1506
- 19 J. J. Holbrook, G. Pfleiderer, J. Schnetger, S. Dimair, Biochem.
Z. 344(1966)1
- 20 J. R. Heitz, C. D. Anderson, B. M. Anderson, Arch. Biochem.
Biophys. 127(1968)627
- 21 W. E. Trommer, H. Kolkenbrock, G. Pfleiderer, Hoppe Seyler's
Z. Physiol. Chem. 356(1975)1455
- 22 W. E. Trommer, K. Friebel, H. -H. Kiltz, H. J. Kolkenbrock,
Adv. Exp. Med. Biol. 86A(1978)187
- 23 P. Knight, G. Offer, Biochem. J. 175(1978)1023
- 24 P. C. Jelenc, C. R. Cantor, S. R. Simon, Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.
75(1978)3564
- 25 R. Uy, F. Wold, Adv. Exp. Med. Biol. 86A (1978)169
- 26 H. Fasold, H. Baumert, G. Fink, Adv. Exp. Med. Biol. 86A (1978)207
- 27 R. R. Traut, J. W. Kenny, Adv. Exp. Med. Biol. 86A (1978)215

- 28 H. Mabouba, H. J. Smith, Adv. Exp. Med. Biol. 86A (1978)247
- 29 K. Ziegler, J. Schmitz, H. Zahn, Adv. Exp. Med. Biol. 86A (1978)345
- 30 J. Carlsson, H. Drevin, R. Axén, Biochem. J. 173 (1978)723
- 31 K. R. Darnell, L. B. Townsend, R. K. Robins, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 57 (1967)548
- 32 P. Roy-Burman, Recent Results Cancer Res. 25 (1970)80
- 33 E. Friedmann, D. H. Marrian, Biochim. Biophys. Acta 2 (1952)61
- 34 E. Friedmann, Biochim. Biophys. Acta 2 (1952)65
- 35 I. E. Liener, Arch. Biochem. Biophys. 121 (1967)67
- 36 E. G. Richard, D. L. Snow, C. W. F. McClare, Biochemistry 5 (1966)485
- 37 S. J. Blazka, H. J. Harwood, Polym. Prepn. Am. Chem. Soc. Div. Polym. Chem. 16 (1975)633
- 38 J. Fischer, W. Heger, F. Janowski, F. Wolf, A. Schellenberger, Acta Biol. Med. Ger. 36 (1972)999
- 39 L. Hellermann, F. P. Clinard, V. Deitz, J. Biol. Chem. 147 (1943)443
- 40 G. Gorin, E. Fuchs, L. G. Butler, S. L. Chopra, R. T. Hersh, Biochemistry 1 (1962)911
- 41 J. G. Franklin, J. Leslie, Biochim. Biophys. Acta 160 (1968)333
- 42 M. Friedman, The Chemistry And Biochemistry Of The Sulfhydryl Group In Amino Acids, Peptides And Proteins, Pergamon Press, Oxford, 1st Edition (1973)230-255
- 43 P. O. Tawney, R. H. Snyder, R. P. Conger, K. A. Leibbrand, C. H. Stiteler, A. R. Williams, J. Org. Chem. 26 (1961)15
- 44 W. Trommer, M. Hendrick, Synthesis (1973)484
- 45 R. J. Cotter, C. K. Sauers, J. M. Whelan, J. Org. Chem. 26 (1961)10
- 46 E. Hedaya, R. L. Hinman, S. Theodoropoulos, J. Org. Chem. 31 (1966)1311
- 47 E. Hedaya, R. H. Snyder, S. Theodoropoulos, J. Org. Chem. 31 (1966)1317
- 48 P. O. Tawney, R. H. Snyder, C. E. Bryan, R. P. Conger, F. S. Dovell, R. J. Kelly, C. H. Stiteler, J. Org. Chem. 25 (1960)56
- 49 J. Am. Chem. Soc. 79 (1957)1710
- 50 S. Combrisson, J. -P. Lautie, M. Olomucki, Bull. Soc. Chim. France (1975)2769

- 51 V.P.Torchilin, E.G.Smirnov, V.N.Smirnov, J.Solid Phase Biochem.2(1977)19
- 52 W.Kuhn, G.Balmer, J.Polym.Sci.57(1962)311
- 53 G.Manecke, H.-J.Middeke, Angew.Makromol.Chem.91(1981)179
- 54 M.Stevens, A.D.Jenkins, J.Polym.Sci.Polym.Chem.Ed.
17(1979)3675
- 55 J.C.Hinch, M.P.Stevens, J.Appl.Polym.Sci.25(1979)1711
- 56 G.L.Ellman, Arch.Biochem.Biophys.82(1959)70
- 57 R.Axén, H.Drevin, J.Carlsson, Acta Chem.Scand.B22(1975)471
- 58 A.Egerov, A.Svensson, L.Rydin, J.Carlsson, Proc.Nat.Acad.
Sci.U.S.A.72(1975)3029
- 59 J.Carlsson, I.Olsson, R.Axén, H.Drevin, Acta Chem.Scand.
B30(1976)180
- 60 J.Brandt, A.Svensson, J.Carlsson, H.Drevin, J.Solid Phase
Biochem 2(1977)105
- 61 J.Carlsson, Hind.Antib.Bull.20(1978)105
- 62 J.P.E.Carlsson, R.E.A.V.Axén, H.N.Y.Drevin, N.Y.Haakan,
G.E.S.Lindgren, Deutsche Offenle-
gungsschrift 2808539 Cl.CO8B37/12
7.9.1978
- 63 C.B.Laurell, E.Thulin, R.P.Bywater, Anal.Biochem.31(1977)336
- 64 P.Z.Bedoukian, J.Am.Chem.Soc.66(1944)631
- 65 W.E.Parham, H.Wynberg, F.L.Ramp, J.Am.Chem.Soc.75(1953)2065
- 66 G.H.Stempel, R.P.Cross, R.P.Mariella, J.Am.Chem.Soc.
72(1950)2299
- 67 R.H.Wiley, J.I.Lin, Y.Kamath, J.Polym.Sci.A1(1968)6, 1065
- 68 T.C.Bruice, S.J.Benkovic, Bioorganic Mechanisms Ed.1
W.A.Benjamin Inc.New York 166
Seite 175 ff
- 69 B.M.Anderson, E.C.Vasini, Biochemistry 2(1970)3348
- 70 J.Leslie, D.L.Williams, G.Gorin, Anal.Biochem.3(1962)3348
- 71 J.M.Milton, I.E.P.Taylor, Biochem.J.113(1969)257
- 72 A.Barth, H.-J.Michel, Die Pharmazie 26(1971)321
- 73 N.M.Tai, F.F.Grennfield, Biotech.Bioeng.23(1981)805
- 74 S.Pantel, H.Weisz, Anal.Chim.Acta 109(1973)351
- 75 K.Shikama, I.Jamazaki, Nature 190(1961)83
- 76 P.C.Jocelyn Biochemistry Of The SH-Group
.Academic Press London, New York 1972
Seite 28

- 77 R. Benesch, R. E. Benesch, *Proc. Nat. Soc.* 84(1958)848
78 R. Benesch, R. E. Benesch, *J. Am. Chem. Soc.* 78(1956)1507
79 S. J. Singer, J. E. Fothergill, J. R. Shainoff, *J. Am. Chem. Soc.*
82(1960)565
80 F. H. White, A. Sandoval, *Biochemistry* 1(1962)238
81 R. Reiner, H. -U. Siebeneick, I. Christensen, H. Lukas,
J. Mol. Catal. 1(1975/76)3
82 R. Reiner, H. -U. Siebeneick, I. Christensen, D. Döring,
J. Mol. Catal. 2(1977)335
83 T. Sipos, J. R. Merkel, *Biochemistry* 2(1970)2766
84 J. E. Gomez, E. R. Birnbaum, G. P. Royer, D. W. Darnall
Biochim. Biophys. Acta 495(1977)177
85 Worthington Enzyme Manual, Worthington Biochemical Corp.
Freehold N.Y. 1973 Seite 129
86 C. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr, R. J. Randall,
J. Biol. Chem. 193(1951)265
87 H. P. Schröer, K. Augsten, *Z. Chem.* 18(1978)391
88 M. L. Bender, F. J. Kézdy, *J. Am. Chem. Soc.* 86(1964)3704
89 B. W. Matthews, P. B. Sigler, R. Henderson, D. M. Blow,
Nature 214(1967)652
90 I. E. Liener, *J. Biol. Chem.* 225(1957)1061
91 A. Light, N. K. Sinha, *J. Biol. Chem.* 242(1967)1358
92 K. A. Walsh, H. Neurath, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 52(1964)884
93 G. Truxmlitz, J. G. Moffart, *J. Org. Chem.* 38(10)(1973)1841
94 R. K. Hill, *J. Org. Chem.* 26(1961)4745
95 N. B. Metha, A. P. Phillips, F. Fu, Lui, R. E. Brooks,
J. Org. Chem. 25(1960)1012
96 C. Keller, J. Rudinger, *Helv. Chim. Acta* 58(2)(1975)531
97 M. M. Bradford, *Anal. Biochem.* 72(1976)248
98 J. Pierce, C. H. Suelter, *Anal. Biochem.* 81(1977)478
99 H. van Kley, S. M. Hale, *Anal. Biochem.* 81(1977)485
100 H. Taniuchi, A. S. Achazya, G. Andria, D. S. Parker, *Adv. Exp. Med. Biol.*
86(1978)247
101 C. B. Anfinsen, E. Haber, *J. Biol. Chem.* 236(1961)1361
102 H. T. Britton, R. A. Robinson, *J. Chem. Soc.* 1931, 1456
103 M. S. Narasinga Rao, G. Kegeles, *J. Am. Chem. Soc.* 80(1958)5724
K. C. Aune, S. N. Timasheff, *Biochemistry* 10(9)(1971)1609

- 104 J.M.Engasser,Biochim.Biophys.Acta 526(1978)301
J.M.Engasser,C.Horvath,Biochim.Biophys.Acta 358(1974)178
- 105 W.Melander,C.Horvath,J.Solid Phase Biochem.2(1977)141
- 106 J.A.Gordon,W.P.Jencks,Biochemistry 2(1963)47
- 107 Y.Nozaki,C.Tanford,J.Biol.Chem.238(1963)4047
- 108 C.Tanford,R.H.Pain,N.S.Otchin,J.Mol.Biol.15(1969)489
- 109 N.C.Pace,C.Tanford,Biochemistry 7(1968)198
- 110 C.Tanford,Adv.Protein Chem.24(1970)1
- 111 H.Lineweaver,D.Burk,J.Am.Chem.Soc.56(1934)658
- 112 D.R.Grassetti,J.F.Murray jr,Arch.Biochem.Biophys
119(1967)41
- 113 E.Cherbuletz,G.Sulzer,Helv.Chim.Acta 8(1925)567
- 114 C.F.Allen,J.R.Thirtle,Org.Synth.Coll.Vol.III,136
- 115 M.A.Phillips,H.Shapiro,J.Chem.Soc.1942,584
- 116 W.Marckwald,W.Klemm,H.Trabert,Ber.Dtsch.Chem.Ges.
33(1900)1559
- 117 P.W.Riddles,R.L.Blakeley,B.Zerner,Anal.Biochem.94(1979)75
- 118 J.F.Robytt,R.J.Ackerman,C.G.Chittenden,
Arch.Biochem.Biophys.147(1971)262

7. Anhang

Puffer nach Britton-Robinson:

A. 11,53 g 85% H_3PO_4 und 6,18 g H_2BO_3 und 6,00 g CH_3COOH
ad 250 cm³.

B. 2 M NaOH

pH	cm ³ (B)
4,0	19,5
5,0	25,8
6,0	29,5
7,0	34,4
8,0	37,6
9,0	40,5

Die angegebenen Volumina wurden mit Lösung A ad 100 cm³ aufgefüllt. Die so dargestellten Pufferlösungen sind Stammlösungen von der zehnfachen Konzentration, die später verwendet wurde.

TRIS-Puffer:

2,54 g Tris(hydroxymethyl)-aminomethan und 12,27 g Natriumchlorid in etwa 80 cm³ Wasser wurden mit verdünnter HCl-Lösung auf den benötigten pH eingestellt und dann ad 100 cm³ mit Wasser aufgefüllt.

Phosphatpuffer pH 7,0:

11,46 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ und 4,91 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ad 1 dm³ mit Wasser

Phosphatpuffer pH 8,0:

17,18 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ und 22,82 g $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$ und 0,196 g 85 % H_3PO_4 ad 2 dm³ mit Wasser

Citrat-Puffer pH 4,0:

5,884 g Citronensäuremonohydrat und 2,240 g NaOH und 0,802 g HCl ad 500 cm³ mit Wasser

Citrat-Puffer pH 5,0:

10,128 g Citronensäuremonohydrat und 3,920 g NaOH ad 500 cm³ mit Wasser

Citrat-Puffer pH 6,0:

6,263 g Citronensäuremonohydrat und 3,160 g NaOH ad 500 cm³ mit Wasser

Lebenslauf

Am 13. Juli 1950 wurde ich in Bad Driburg geboren. Meine Eltern sind Josef Middeke (Bankangestellter) und seine Ehefrau Anneliese Middeke, geborene Hartung. In Bad Driburg kam ich am 1. April 1957 zur katholischen Volksschule bis zum 28. März 1961. Am 13. April dieses Jahres ging ich zum altsprachlich-humanistischen Gymnasium, der Missionsschule St. Xaver. Hier erhielt ich am 22. Mai 1969 das Zeugnis der Reife. Am 13. Oktober 1969 wurde ich im Fachbereich Chemie an der Freien Universität Berlin immatrikuliert. Ich habe das Chemie-Studium am 13. Januar 1978 mit dem Diplom abgeschlossen. Die Diplomarbeit "Über einige reaktionsfähige Hochpolymere und ihre Umsetzungen" wurde am Fritz-Haber-Institut der Max Planck Gesellschaft angefertigt, ebenso die vorliegende Dissertation. Seit 1980 bin ich als Assistent an der Freien Universität Berlin in der Lehre tätig.

